

**A GOMBA EREDETŰ ELICITOR KITOZÁN HATÁSA A  
ZÁRÓSEJTEK MŰKÖDÉSÉRE: A SZTÓMAMOZGÁS ÉS A  
ZÁRÓSEJT FOTOSZINTÉZISÉNEK KAPCSOLATA**

**Doktori (Ph.D) értekezés**

**Ördög Attila**

**Témavezető:**

**Dr. Horváth Ferenc**



**Biológia Doktori Iskola**

**Szegedi Tudományegyetem**

**Természettudományi és Informatikai Kar**

**Növénybiológiai Tanszék**

**Szeged, 2014**



## TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....	i
1. BEVEZETÉS .....	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	3
2.1. A MIKROORGANIZMUSOK FELISMERÉSE: „BARÁT VAGY ELLENSÉG” .....	3
2.1.1. A mikroorganizmusokhoz kapcsolható molekuláris mintázatok felismerése .....	3
2.1.2. A kitin és kitozán, mint MAMP-k érzékelése .....	6
2.2. A ZÁRÓSEJTEK, MINT A PATOGÉNEKSEL SZEMBENI VÉDEKEZÉS ELSŐ BÁSTYÁI .....	7
2.3. A ZÁRÓSEJTEK OZMOREGULÁCIÓS SZABÁLYOZÁSA .....	8
2.3.1. Az ozmoregulációs szabályozás kutatásának alakulása .....	8
2.3.2. A SZTÓMANYITÓDÁS ÉS ZÁRÓDÁS FOLYAMATA, SZABÁLYOZÁSI LEHETŐSÉGEI .....	9
2.4. A SZTÓMAMOZGÁSOK ÉS A ZÁRÓSEJTEK FOTOSZINTETIKUS AKTIVITÁSÁNAK KAPCSOLATA .....	14
2.4.1 A zárósejtek fotoszintetikus aktivitásának jelentősége .....	16
2.4.2. A zárósejtek klorofill a fluoreszcencia vizsgálata .....	16
2.5. A NO ÉS A REAKTÍV OXIGÉN FORMÁK (ROS), MINT JELÁTVIVŐ MOLEKULÁK SZEREPE A SZTÓMAMOZGÁSOK ÉS A MAMP-INDUKÁLTA VÉDEKEZÉSI VÁLASZOK KIALAKÍTÁSÁBAN .....	18
2.5.1. A NO általános jellemzése .....	18
2.5.2. A NO keletkezése a zárósejtekben .....	20
2.5.3. A ROS általános jellemzése .....	21
2.5.4. A ROS bioszintézise .....	22
2.5.5. A NO és a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> szerepe a fehérjék poszttranszlációs módosításában (PTM) .....	23
2.5.6. A NO fotoszintézisre gyakorolt hatása .....	24
2.5.7. A ROS hatása a fotoszintézisre .....	25
3. CÉLKITŰZÉSEK .....	26
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....	27
4.1. Növénynevelés .....	27
4.2. Kísérleti oldatok és kezelés .....	27
4.3. A NO koncentráció meghatározása .....	28
4.4. Sztóma pórusátmérő meghatározása .....	28
4.5. Epidermisz nyúzatok előkészítése a zárósejteken végzett Microscopy-PAM mérésekhez ...	28
4.6. Klorofill a fluoreszcencia mérések Microscopy-PAM fluoriméter segítségével .....	29
4.7. Fluoreszcencia indukció és kioltás analízis .....	30

---

4.8. A H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> és a NO kvalitatív vizsgálata fluoreszcens jelölők segítségével konfokális lézer pásztázó mikroszkóp használatával .....	32
4.9. Statisztikai analízis.....	33
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	34
5.1. A kitozán a sztómanyitódást hajnalban gátolja, napközben pedig további nyitódás- gátlást és enyhe záródást okoz .....	34
5.2. A kitozán szerepe a zárósejtek jelátvitelének alakításában .....	36
5.2.1 A kitozán-kezelés hatására keletkező H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> detektálása.....	37
5.2.2. A kitozán-kezelés hatására keletkező NO detektálása .....	38
5.3. A kitozán SZEREPE A ZÁRÓSEJTEK FOTOSZINTÉZISÉBEN.....	40
5.3.1 A hajnali kitozán-kezelés gátolja ETR növekedését.....	40
5.3.2. A fotoszintetikus paraméterek alakulása hajnali kitozán-kezelés után .....	42
5.3.3. A fotoszintetikus paraméterek alakulása napközbeni kitozán-kezelés után .....	44
5.4 A külső H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> kezelés hatása a zárósejtek fluoreszcencia paramétereire .....	45
5.5. A NO hatása a zárósejtek fotoszintetikus aktivitására .....	47
5.5.1. Az NO-donor GSNO specifikussága, fotolízise melléktermékeinek hatásai és a GSNO-ból felszabaduló NO mennyisége .....	47
5.5.2. A NO hatása a zárósejtek fluoreszcencia paramétereire. Reverzibilitás.....	49
5.5.3 A NO által okozott változások kinetikai háttere.....	52
5.5.4 A NO mellé adott bikarbonát helyreállítja qP-t és fokozza az NPQ konstans emelkedését .....	52
5.5.5. A fotoszintetikus paraméterek helyreállíthatósága a NO-kezelést követően.....	53
5.6. A kitozán, feltehetően a NO bioszintézisét indukálva, gátolja a zárósejtek fotoszintetikus aktivitását.....	55
6. KONKLÚZIÓ.....	60
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	62
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	71
DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI .....	72
SUMMARY OF THE THESIS .....	78
PUBLIKÁCIÓS LISTA.....	83

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABS	Abszcizinsav
AL	Aktinikus megvilágítás
AR	Amplex Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazin)
BR	Bazális rezisztencia
CDPK	Ca <sup>2+</sup> -függő protein kinázok
cGMP	Ciklikus guanidin-monofoszfát
CHT	Kitozán
CNGC	Ciklikus-nukleotid-kapuzott Ca <sup>2+</sup> ioncsatorna
cPTIO	2-(4-karboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxid-3-oxid (NO-kioltó)
DAF-FM DA	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluoro-fluoreszcein diacetát
DAMP	Veszélyhez-kapcsolható molekuláris mintázatok DCMU 3-(3,4-diklorofenil)-1,1-dimetilurea
DPI	Difenilén-jodónium
EF-Tu	Bakteriális növekedési faktor Tu
EPR	Elektron paramágneses rezonancia spektroszkópia
ETI	Effektor-indukált immunitás
ETR	A lineáris elektrontranszportlánc sebessége
ETS	Effektor-indukált fogékonyság (effector-triggered susceptibility)
flg22	A bakteriális flagellin 22 aminosavas epitópja
$\Phi_{PSII}$	A PSII effektív kvantumhatékonysága
$F_v/F_m$	A sötétadaptált PSII maximális kvantumhatékonysága
$F_v'/F_m'$	A fény adaptált PSII maximális kvantumhatékonysága
GSNO	S-nitrozo-glutation
GSSG	Oxidált glutation

---

GMP	Guanidin-monofoszfát
HR	Hiperszenzitív reakció
iGSNO	Fény inaktivált GSNO
$K^+_{in}$	A befelé egyenirányító $K^+$ ioncsatornák áramai
$K^+_{out}$	A kifelé egyenirányító $K^+$ ioncsatornák áramai
LC	Lassú fényindukciós görbék
L-NAME	N-nitro-L-Arg-metil-észter
LPS	Lipopoliszacharid
MAMP	Mikroorganizmusokhoz kapcsolható molekuláris mintázatok
MAP	Mitogén-aktivált protein
MKK	MAPK-kinázok
MPK	MAPK-kináz-kinázok
NOS	Nitrogén-monoxid szintáz
NPQ	Stern-Volmer-féle nem-fotokémiai kioltás
NR	Nitrát-reduktáz
NIA1, NIA2	NR enzim formái
$P_{680}$	A PSII elsődleges elektrondonora
PAM	Impulzus amplitúdó modulált
PAMP	Patogénekhez kapcsolható molekuláris mintázatok
PM	Plazmamembrán
PM $H^+$ -ATPáz	Plazmamembránban található P-típusú $H^+$ -ATPáz
PP1/PP2A	Protein foszfatáz 1 és 2A
PP2B	Protein foszfatáz 2B (kalcineurin)
PP2C	Protein foszfatáz 2C
PPFD	Fotoszintetikusán aktív fotonáram-sűrűség
PRR	Mintázat felismerő receptor
PSI	Első fotokémiai rendszer

---

PSII	Második fotokémiai rendszer
PTI	Eldődleges immunválaszok
Q <sub>A</sub>	A PSII elsődleges kinon elektronakceptora
Q <sub>B</sub>	A PSII másodlagos kinon elektronakceptora
qE	A nemfotokémiai kioltás energiafüggő komponense
qI	A nemfotokémiai kioltás fotoinhibíciós komponense
qL	A PSII RC-k közti kapcsoltságot feltételező a fotokémiai kioltási együttható
qP	Fotokémiai kioltási együttható
RC	Reakciócentrum
RLC	Gyors fényindukciós görbék
RLK	Receptor-szerű kinázok
RLP	Receptor-szerű fehérjék
ROS	Reaktív oxigén formák
Rubisco	Ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz-oxigenáz
RuBP	Ribulóz-1,5-biszfoszfát
SAR	Szisztémikus védekezési válaszok
SD	Standard deviancia
sGC	Szolubilis guanilát ciklázt
SNAP	S-nitrozo-acetilpenicillamin
SNP	Nátrium-nitroprusszid
SP	Telítő fényimpulzus
V-ATPáz	Vakuoláris ATPáz
V-PPáz	Vakuoláris H <sup>+</sup> -pirofoszfátáz
Y <sub>D</sub>	A PSII D2 fehérje tirozin-D oldallánca
Y <sub>Z</sub>	A PSII D1 fehérje tirozin-Z oldallánca

## 1. BEVEZETÉS

A sztómák a szárazföldi növények epidermiszének olyan speciális tulajdonságú sejtjei, melyek turgor állapotuk megváltoztatásával, mint apró hidraulikus szelepek képesek a külső környezet és a levelek belső szövetei közötti gázcseré és a párologtatás szabályozására. A sztómák két darab speciális epidermális eredetű sejtből, a zárósejtekből és a köztük található pórusból épülnek fel. A zárósejtek mellett, hogy a párologtatáson keresztül segítik a levelek hőmérsékletének szabályozását, néhány mikrométeres szenzorként is működnek. Egyaránt képesek a belső hormonális és a külső környezeti jelek érzékelésére. Mindemellett, rendkívül fontos szerepük van a patogének elleni harcban is. A növényi sejtfa emésztésére képtelen patogének a nyitott sztómákon, mint természetes nyílásokon keresztül bejutva akár az egész növény megfertőzésére képesek. A sztómáknak így, mint a növényi immunrendszer első bástyáinak fontos szerepük van a különböző mikroorganizmusok felismerésében, és a megfelelő védekezési válaszok elindításában. A legáltalánosabb védekezési válaszok közül példaként megemlíthetjük a sztómazáródást, a patogenezishez köthető gének átíródását vagy végső esetben a hiperszenzitív reakció beindulását is. Mindhárom fenti példa hátterében a zárósejtekben található számtalan jelátviteli útvonal egyikének vagy akár azok hálózatainak aktiválódása húzódik meg. Azonban a növények környezetében megtalálható minden egyes mikroorganizmus ellen egyetlen növény sem lenne képes megfelelő speciális védelmi rendszert kiépíteni. Ezért a növények az úgynevezett mikroorganizmusokhoz kapcsolható molekuláris mintázatok (MAMP) felismerésével próbálják azonosítani az egyes mikroorganizmus csoportokat. A MAMP-k között igen változatos eredetű és felépítésű molekulákat vagy molekula darabokat figyelhetünk meg, ilyenek például a gomba sejtfa eredetű kitin és kitozán, a bakteriális flagellin 22 aminosavas epitópja, az flg22, a különböző növényi oligo- és poliszacharidok (pl. oligogalakturonidok), a Gram-negatív baktériumok lipopoliszacharidjai (LPS) vagy a különféle növekedési faktorok, mint például a bakteriális elongációs faktor EF-Tu.

Munkánk során a MAMP-k közül a kitozán sztómaműködésére gyakorolt hatásait tanulmányoztuk lóbab (*Vicia faba L.*) modellnövény esetében. Borsó (*Pisum sativum L.*) növényeken végzett kísérletek irodalmi adatai alapján igen erős hatásra számíthattunk mind a sztómazáródás, mind pedig a nyitódás terén. Számos kutatócsoport munkájának



köszönhetően a kitozán hatására indukálódó sztómazáródás jelátviteli háttere borsóban már szinte teljesen feltárt, így célul tűztük annak megvizsgálását is, hogy vajon ugyanaz a jelátviteli út aktiválódik-e *Vicia faba* zárósejtek esetében is.

A zárósejtek működésének energiaigényét elsősorban a mitokondriumok biztosítják, azonban számos kísérlet bizonyítja a zárósejtekben található kloroplasztiszok hozzájárulását is. Mivel a kitozán molekulaszervezete miatt a növényi sejtekbe nem juthat, és csak közvetve képes hatást gyakorolni a sejten belüli folyamatokra, így célul tűztük ki a jelátviteli során felhalmozódó szignálkomponensek fotoszintézisre gyakorolt hatásának vizsgálatát is. Elsősorban a hidrogén-peroxid ( $H_2O_2$ ) és a nitrogén-monoxid (NO) lineáris elektrontranszportláncra gyakorolt hatását szeretnénk volna részletesebben megismerni. A  $H_2O_2$ , mint gyakori reaktív oxigén forma, a kloroplasztiszokban jelentősen felhalmozódva, a fotoszintetikus pigmentek és fehérjék degradációjával vagy a tilakoid membránok lipidperoxidációján keresztül lassíthatja a fotoszintézist zárósejtekben is. A NO-ról jól ismert, hogy gátolja a lineáris elektrontranszportláncot. Az elektron paramágneses rezonancia spektroszkópia (EPR) és a második fotokémiai rendszer (PSII) klorofill *a* fluoreszcenciájának vizsgálatai során egyértelműen bebizonyosodott, hogy a NO reverzibilis kötődése révén a PSII több pontján is gátolhatja az elektronok továbbítását, ezáltal jelentősen lassítva a fotoszintetikus aktivitást.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A növények, helyhez kötött életmódjukból adódóan szoros kapcsolatban élnek az őket körülvevő számos mikroorganizmussal. A mikroorganizmusok határtalan sokszínűségének köszönhetően a növények közvetlen környezetében sok jótékony hatású és káros vagy patogén faj is megtalálható [1]. Azonban ezen élőlények legtöbbször nem befolyásolja a növény általános életfolyamatait, növekedését.

### 2.1. A MIKROORGANIZMUSOK FELISMERÉSE: „BARÁT VAGY ELLENSÉG”

Bizonyos esetekben előnyös kölcsönhatások is kialakulhatnak a növények és a mikroorganizmusok között, mint például a gyökérgümők fejlesztéséért felelős *baktérium*- vagy gombafajok esetében. Mivel a növények számára az előnyös tulajdonságokat nyújtó mikrobák is idegen élőlénynek számítanak, így fontos a mikrobák és a növények közötti aktív kölcsönhatások kialakítása. Ezek lehetővé teszik azon bensőséges mutualista kapcsolatok létrejöttét, melyek a növények növekedéséhez és fejlődéséhez szükséges megfelelő körülményeket biztosítani tudják [2].

A patogén mikrobák között egyaránt megtalálhatjuk a vírusokat, baktériumokat, gombákat és a petespórás gombák, az *Oomycota* törzsébe tartozó fajokat is. Összességében kijelenthetjük, hogy a patogén mikrobák előfordulásukat tekintve elég ritkák, azonban mivel még így is nagy veszélyt jelentenek a növényekre, egy kifinomult védelmi rendszer kifejlesztése vált szükségessé. Ahhoz azonban, hogy hatékonyan tudjanak védekezni a növény-asszociált mikrobákkal szemben, a növényeknek nemcsak felismerniük kell az egyes mikrobákat, hanem képesnek is kell lenniük a hasznos és a káros (patogén) mikroorganizmusok közötti különbségek felismerésére, majd pedig a megfelelő válaszreakciók elindítására [3].

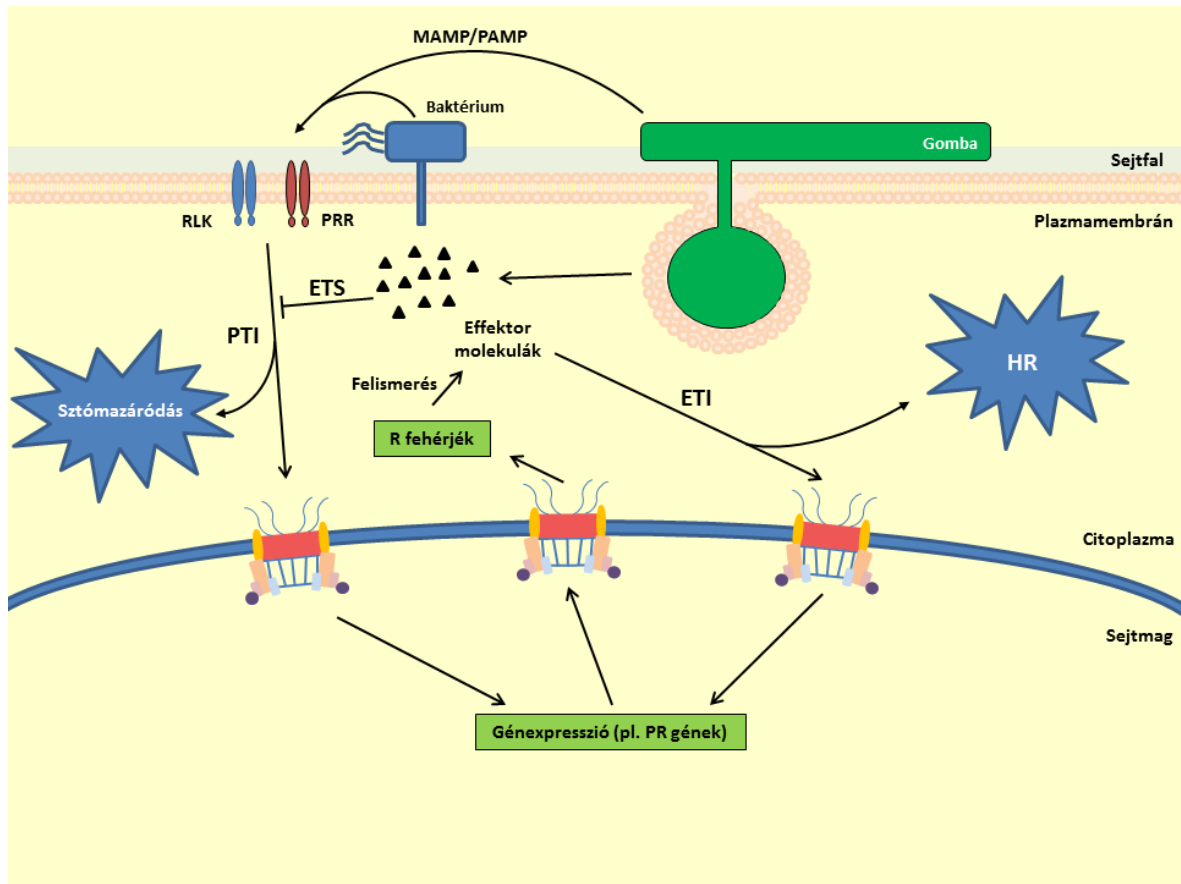
#### 2.1.1. A MIKROORGANIZMUSOKHOZ KAPCSOLHATÓ MOLEKULÁRIS MINTÁZATOK FELISMERÉSE

Az állatokhoz hasonlóan a növények is rendelkeznek immunrendszerrel, mely egy-egy sikeresen azonosított támadás során képes aktív állapotba kerülni [4-6]. A folyamat első lépése az idegen molekulák felismerése, mely a sejtek felszínén megtalálható mintázat felismerő receptorok (pattern recognition receptor – PRR) révén valósul meg. Ezek a PRR-k teszik lehetővé az egyes MAMP-k felismerését. Egyes terminológiákban a MAMP-t más néven patogénekhez kapcsolható molekuláris mintázatoknak (PAMP) is nevezik [7]. A MAMP/PAMP-k PRR-k általi felismerése a bazális rezisztencia (BR) vagy más néven az

úgynevezett PAMP által kiváltott immunitás (PAMP-triggered immunity – PTI) kialakulásához vezet, ami a patogénnel szembeni első válaszlépésnek tekinthető [8]. A PTI kiváltására a patogén támadások során a növényi sejtek sérüléséből keletkező termékek is képesek. Az ilyen sérülésből keletkező, legtöbbször oligomer szerkezetű vegyületeket összefoglaló néven veszélyhez-kapcsolható molekuláris mintázatoknak nevezték el (danger-associated molecular pattern – DAMP) [7]. A PTI kialakulását megakadályozandó, egyes patogének képesek ún. effektor molekulák (pl. oxálsav, cryptogein) szintézisére. Az effektor molekulák segítségével a patogének szuppresszálni tudják a PTI kialakulását vagy már aktiválódott PTI esetén képesek az indukált védekezési válaszok elfojtására, így biztosítva a sikeres fertőzést (ETS – effector-triggered susceptibility). A védelmi rendszer második vonalában növényi védekezési gének termékei felismerik az avirulens effektor molekulákat, és effektor-indukált immunitás (ETI) alakul ki. Az ETI hiperszenzitív reakcióhoz is vezet, ami a fertőzés környezetében található sejtek programozott sejthalálával (PCD) igyekszik a fertőzés további terjedését megakadályozni (1. ábra).

A legjobban jellemzett növényi PRR-k a receptor-szerű kinázok (RLK) vagy a receptor-szerű fehérjék (RLP) családjába tartoznak. Az RLK-k membránba ágyazott fehérjék, melyek egy extracelluláris ligand felismerő- és egy intracelluláris kináz doménnel rendelkeznek. Az RLP-k szerkezete nagyon hasonlít az RLK-k felépítésére, azonban hiányzik az intracelluláris doménjük. *Arabidopsis thaliana*-ban eddig több mint 600 RLK-t azonosítottak, azonban a MAMP észlelésben betöltött szerepüket eddig csak kis hányaduk esetében sikerült bizonyítani. Egyes RLK-ról bebizonyosodott, hogy egyéb élettani folyamatban is fontos szerepük van (pl. fejlődési folyamatok), azonban a legtöbbjük funkciója még nem ismert [7, 9].

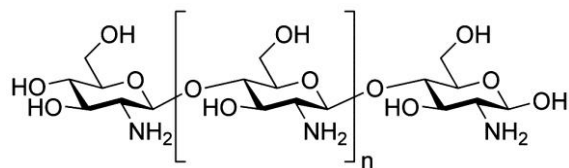
Annak ellenére, hogy a 600 RLK és a MAMP felismerésben szerepet játszó egyéb fehérjék kombinációja igen nagyszámú mikroba felismerését teszi lehetővé, a szinte végtelen számú mikroorganizmussal szemben ez mégsem nyújt tökéletes védelmet. Azért, hogy a növények képesek legyenek a lehető legnagyobb számú mikroba érzékelésére, a mikroorganizmusok nagyobb csoportjaira jellemző közös struktúrák, az ún. molekuláris mintázatok felismerésére törekszenek. A növények által felismert általános MAMP molekulák közül a kitin (és a kitozán), a LPS-k, a növekedési faktor Tu (EF-Tu) és a flagellin által aktivált jelátviteli utak már jól ismertek [3].



1. ábra A bakteriális és gomba eredetű MAMP/PAMP által indukált védelmi válaszreakciók sematikus ábrázolása. A MAMP/PAMP kötődését követő PRR dimerizáció révén különböző védekezési válaszreakciók (PTI) indukálódnak (pl. sztómazáródás). A mikroorganizmusok a PTI kivédésére különféle effektor molekulákat juttatnak egyrészt saját másrészt a gazda sejt környezetébe és citoplazmájába egyaránt. Az effektor molekulák képesek a PTI szuppresszálására (ETS), ezáltal biztosítva a sikeres patogén támadás lefolyását. A PTI hatására többek között indukálódik a védekezésben szereplő gének átíródása is. Az újonnan képződött fehérjék bizonyos esetekben képesek az effektor molekulák felismerésére, majd a patogének elleni második védekezési vonal az ETI elindítására. AZ ETI leggyakoribb formája a hiperszenzitív reakció (HR) (Woloshen, 2011 alapján [10]).

## 2.1.2. A KITIN ÉS KITOZÁN, MINT MAMP-K ÉRZÉKELÉSE

A kitin N-acetil-glükózamin monomerekből álló polimer, mely a gombák sejtfalának alapvető fontosságú építőeleme. A kitozán a kitin deacetilálódása révén keletkező,  $\beta$ -(1-4)-D-glükózamin (deacetilált egység) és N-acetil-D-glükózamin (acetilált egység)



2. ábra A kitozán szerkezeti képlete

monomerek kapcsolt hálózatából felépülő polimer (2. ábra). A kitint és a kitozánt mind az állati, mind pedig a növényi immunrendszer felismeri. A kitin- és a kitozán-kezelés az egyszikűek és a kétszikűek esetében is képes aktiválni a védekezési válaszokat [11]. A kitin felismeréséért rizs esetében a plazmamembránban található kitin elicitor-kötő fehérje (*OsCEBiP*) felelős. Az *OsCEBiP* esetében hiányzik az intracelluláris kináz domén, ezért a kitin indukálta védelmi válaszok aktiválásához szüksége van egy újabb fehérje közreműködésére [12]. A rizs kitin elicitor receptor kináz 1 (*OsCERK1*) lehet az egyik olyan fehérje, ami képes az *OsCEBiP*-vel hetero-oligomer kialakítására [12, 13]. Mind az *OsCERK1*, mind pedig az *OsCEBiP* tartalmaz olyan extracelluláris lizin oldallánc motívumokkal rendelkező doméneket (LysM), melyek a kitin kötéséért felelősek. A LysM domének szerkezetének megismerése révén további növény fajok esetében is sikerült lehetséges kitin-kötő fehérjéket azonosítani. Az *Arabidopsis thaliana*-ban található *AtCERK1* három ilyen LysM domént tartalmaz. Amennyiben a másodikhoz egy 8 monomerből álló kitin oligomer kötődik, az *AtCERK1* dimerizációját követően beindulnak a védekezési válaszok [14-16]. Az *AtCERK1*-n kívül sikerült további három kitin elicitor-kötő fehérje-szerű fehérjét is azonosítani *Arabidopsis*-ban, azonban e fehérjéket kódoló gének mutációja nem befolyásolta a kitin által indukált jelátviteli folyamatokat. Ez arra utal, hogy a kitin elicitor-kötő fehérje-szerű fehérjéknek nincs közvetlen szerepük a kitin-indukált szignalizációban. Sikerült azonban egy újabb olyan LysM-tartalmú receptor kinázt azonosítani (*LYK4*), aminek feltehetően szerepe lehet a kitin indukálta védekezési válaszok kiváltásában [17]. Ennek a receptor kináznak a jelátvitelben betöltött pontos szerepe azonban még nem teljesen tisztázott.

## 2.2. A ZÁRÓSEJTEK, MINT A PATOGÉNEKKEL SZEMBENI VÉDEKEZÉS ELSŐ BÁSTYÁI

A sztómák a szárazföldi növények levelein megtalálható apró, szabályozható átmérőjű pórusok, melyek már több mint négyszáz millió évvel ezelőtt a szilúr időszakban megjelentek [18, 19]. A sztómákat két, az epidermisz sejtektől jelentősen eltérő speciális sejt, a zárósejt határolja, melyek változó térfogatukkal a sztómapórus átmérőjének szabályozásáért felelősek. A zárósejt párok néhány faj esetében változatos számú melléksejttel kiegészülve alkotják a sztómakomplexeket. A melléksejtek mechanikusan vagy a sztómamozgásokhoz szükséges ionok biztosításával segíthetik a zárósejtek működését a nyitódás vagy a záródás során [20].

Minthogy a bőrszövetet borító kutikula réteg gyakorlatilag átjárhatatlan a széndioxidra (CO<sub>2</sub>) és a vízre nézve, így a sztómák központi szerepet játszanak a levelek belső tere és a külvilág közötti gázcsere szabályozásában [21]. A zárósejtek amellet, hogy a párologtatáson keresztül segítik a levelek hőmérsékletének szabályozását, pár mikrométeres szenzorként is működnek. Képesek a belső- (pl. hormonok) vagy a külvilágból érkező jelek (pl. CO<sub>2</sub>, szén-monoxid, ózon, különféle nitrogén-oxidok, kén-oxidok) érzékelésére.

Az elmúlt egy-másfél évtized kutatási eredményei azt sugallják, hogy a zárósejtek szerepe nem merül ki az abiotikus faktorok érzékelésében, hanem nagyon fontos szerepet töltenek be a patogénekkal szembeni harcban is. A zárósejtek, mint a patogének elsődleges természetes bejutási pontjai, képesek az egyes patogén csoportokra jellemző MAMP-k felismerésére, majd az ezt követő megfelelő válaszreakció elindítására. Ilyen válaszreakciók lehetnek például a gomba sejtfa eredetű kitozán vagy a növényi sejtfa eredetű oligogalakturonsav (OGA) esetében a hidrogén-peroxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) felszabadulás és fény-indukált sztómanyitódás gátlás indukciója [22]. Ezen kívül *Arabidopsis thaliana*-ban mindkét vegyület hatására sztómazáródás is történt [23]. A bakteriális flagellin 22 aminosavas oligopeptid epitópja, az flg22, valamint az LPS és az EF-Tu felismerése egyaránt sztómazáródást okozott. Az flg22 esetében bebizonyosodott, hogy az érzékelést követően csökkentek a plazmamembránban található K<sup>+</sup> influx ioncsatornák áramai (K<sup>+</sup><sub>in</sub>) [24].

### 2.3. A ZÁRÓSEJTEK OZMOREGULÁCIÓS SZABÁLYOZÁSA

A sztómák nyitódása és záródása szorosan kapcsolódik a zárósejtek vízháztartási paramétereire. Az ionok felvétele és a szerves vegyületek szintézise miatti ozmotikus potenciál csökkenés, a víz zárósejtekbe történő passzív beáramlását okozza. A zárósejtek rendkívül elasztikus sejtfaainak köszönhetően a térfogatuk akár a kiindulási érték 100%-val is növekedhet. A sejtfaalak különböző összetételének és vastagságának köszönhetően, a sejtek térfogat változásának megfelelően végbemegy a nyitódás vagy a záródás folyamata.

#### 2.3.1. AZ OZMOREGULÁCIÓS SZABÁLYOZÁS KUTATÁSÁNAK ALAKULÁSA

Már több mint 100 évvel ezelőtt megfigyelték, hogy a zárósejtekben éjjel, zárt állapotban sokkal több keményítő található, mint nappal, nyitott állapotban [25]. Ez a megfigyelés vezetett a keményítő-cukor hipotézis felállításához, ami a keményítő-cukor átalakulás által okozott ozmotikus változással magyarázta a nyitódás – záródás folyamatait. Ez a hipotézis majdnem 50 évig teljesen elfogadott volt, ekkor azonban Fischer és munkatársai rámutattak a  $K^+$ -felvétel sztómanyitódásban betöltött szerepére [26, 27]. Bizonyítást nyert az is, hogy a  $K^+$  ellenionjaként bizonyos esetekben a malát<sup>2-</sup> és a  $Cl^-$  is szerepet kaphat [27-30], és ezzel gyakorlatilag az új  $K^+$ -malát<sup>2-</sup> modell felváltotta a korábbi keményítő-cukor hipotézist. Az új elgondolást MacRobbie és Lettau [31, 32] *Commelina communis*-on végzett kísérletsorozata egészítette ki, melynek során bebizonyították, hogy a  $K^+$  és a malát<sup>2-</sup> önmagában nem tudta volna biztosítani a nyitott állapot fenntartásához szükséges ozmotikum mennyiségét, így arra jutottak, hogy a fotoszintetikus eredetű cukrok további ozmotikumként segíthetik a nyitódást, illetve a nyitott állapot fenntartását. Később ezt a megfigyelést több kutatócsoport is megerősítette [33-37], így elfogadottá vált, hogy a  $K^+$  és a malát<sup>2-</sup> anionok mellett a fotoszintetikus eredetű cukrok szerepe sem elhanyagolható.

A különböző növényfajokon végzett kísérletekből származó ellentmondásos eredmények feloldására Talbott és Zeiger [36, 38] három különböző útvonal elkülönítését javasolta, amelyek magukban foglalják mind a  $K^+$ , a  $Cl^-$ , a malát<sup>2-</sup>, a szacharóz, valamint a kloroplasztiszok befolyásoló szerepét is. Azt is hangsúlyozták, hogy a három útvonal sztómaműködéshez történő hozzájárulása napszaktól, növényi fajtól, nevelési és kísérleti körülményektől egyaránt függhet. Az első útvonal a hajnali, kék fény által indukált sztómanyitódást írja le, mely során  $K^+$  és  $Cl^-$  ionok áramlanak a zárósejtekbe, illetve a citoplazmában a keményítő lebontásából származó malát<sup>2-</sup> anionok, mint a  $K^+$  ellenionjai is

megjelennek. A második, a 3-(3,4-diklorofenil)-1,1-dimetilureára (DCMU)-inszenzitív útvonal során a keményítőből malát<sup>2-</sup> helyett szacharóz szintetizálódik, és ily módon növekszik az ozmotikumok mennyisége a citoszolban. A harmadik, DCMU-ra érzékeny útvonal során a zárósejtek fotoszintetikus aktivitása biztosítja az ozmotikumként szolgáló cukrokat, például a szacharózt.

Összefoglalásként tehát kijelenthetjük, hogy a reggeli nyitódás során elsősorban a K<sup>+</sup> és ellenionjai biztosítják a szükséges ozmotikumot, míg később a nap folyamán egyre nagyobb szerephez jut a fotoszintetikus eredetű cukrok megjelenése (mezofillum és zárósejt eredetűek egyaránt).

### 2.3.2. A SZTÓMANYITÓDÁS ÉS ZÁRÓDÁS FOLYAMATA, SZABÁLYOZÁSI LEHETŐSÉGEI

#### **Sztómanyitódás**

A sztómanyitódás fényindukált folyamatok eredőjeként magyarázható, ahol a fény minőségétől függően különböző jelátviteli útvonalak aktiválódnak.

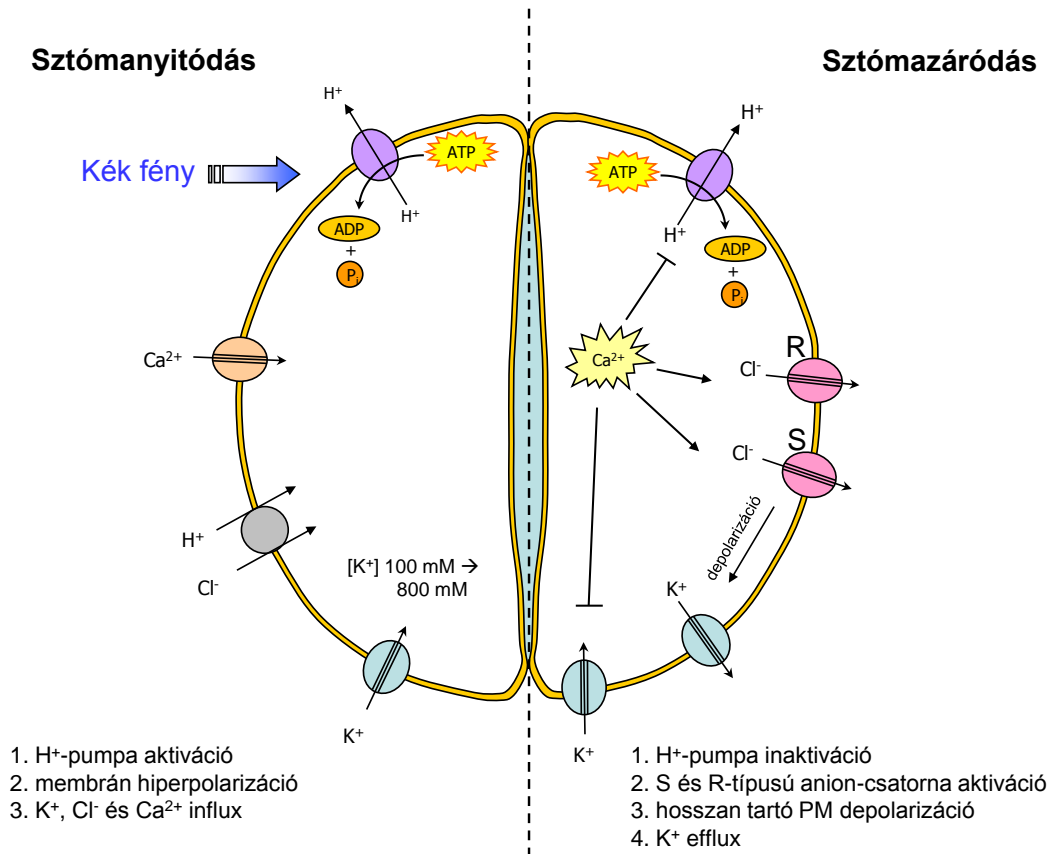
A hajnali sztómanyitódás során (3. ábra; sztómanyitódás) a kék fény hatására a plazmamembránban található P-típusú H<sup>+</sup>-ATPáz (PM H<sup>+</sup>-ATPáz) aktiválódik [39], ATP energiáját felhasználva protonokat juttat az extracelluláris térbe, növelve a membrán két oldala között fennálló, protonokra vonatkozó elektrokémiai potenciálkülönbséget. Az elektrogén protonpumpa működésével hiperpolarizálódó membránon a K<sup>+</sup> és Ca<sup>2+</sup> ionok passzív felvétele feszültség-függő ioncsatornákon, az anionok felvétele anion/H<sup>+</sup> szimporter rendszeren keresztül valósul meg [40].

A vörös fény hatására bekövetkező sztómanyitódás a zárósejtek kloroplasztisaiból származó ATP és NADPH felhasználásával magyarázható, melyek energiája keményítő lebontására (malát<sup>2-</sup> anionok szintézise), valamint a PM H<sup>+</sup>-ATPáz működtetésére fordítódik [41]. A különböző útvonalak szerepét a lineáris elektrontranszportlánc és a mitokondriális elektrontranszportlánc blokkolóinak alkalmazásával sikerült bizonyítani. A kék fény indukálta nyitódás kálium-cianiddal (KCN), a mitokondriális elektrontranszport lánc gátlószerével történő erős gátlása arra utal, hogy a PM H<sup>+</sup>-ATPáz működéséhez szükséges energia nagyobb részben a mitokondriális oxidatív foszforilációból származik [42]. Mawson és munkatársai [43] azonban a fotoszintetikus elektrontranszportlánc DCMU-val történő blokkolása során csökkent ATP koncentrációt figyeltek meg a



citoszolban, amiből arra következtettek, hogy a fotofoszforilációs és az oxidatív foszforilációs folyamatok egyaránt hozzájárulnak a nyitódás energiaigényének fedezéséhez.

### Sztómazáródás



3. ábra A sztómanyitódás és záródás folyamata során aktiválódó transzporterek és folyamatok.

A sztómazáródás, a folyamat sebessége és komplexitása miatt a korai szignál-transzdukció vizsgálatának fontos modellrendszerévé vált. A zárósejtek plazmodezmás összeköttetések híján, a környező sejtektől elhatárolt jelátviteli- és transzportrendszerrel rendelkeznek. A sztómazáródást kiváltó külső- és belső környezeti ingerek legtöbbször egymás hatását felerősítve fejtik ki hatásukat; az egyedi jelátviteli utak egymással szoros kapcsolatban, a sejten belül szignál-transzdukciós hálózatot alakítanak ki.

A transzdukciós hálózat három szabályozási útvonalra: a  $Ca^{2+}$ -függő, a pH-függő és a zárósejt foszforilációs homeosztázisától függő újtára különül.

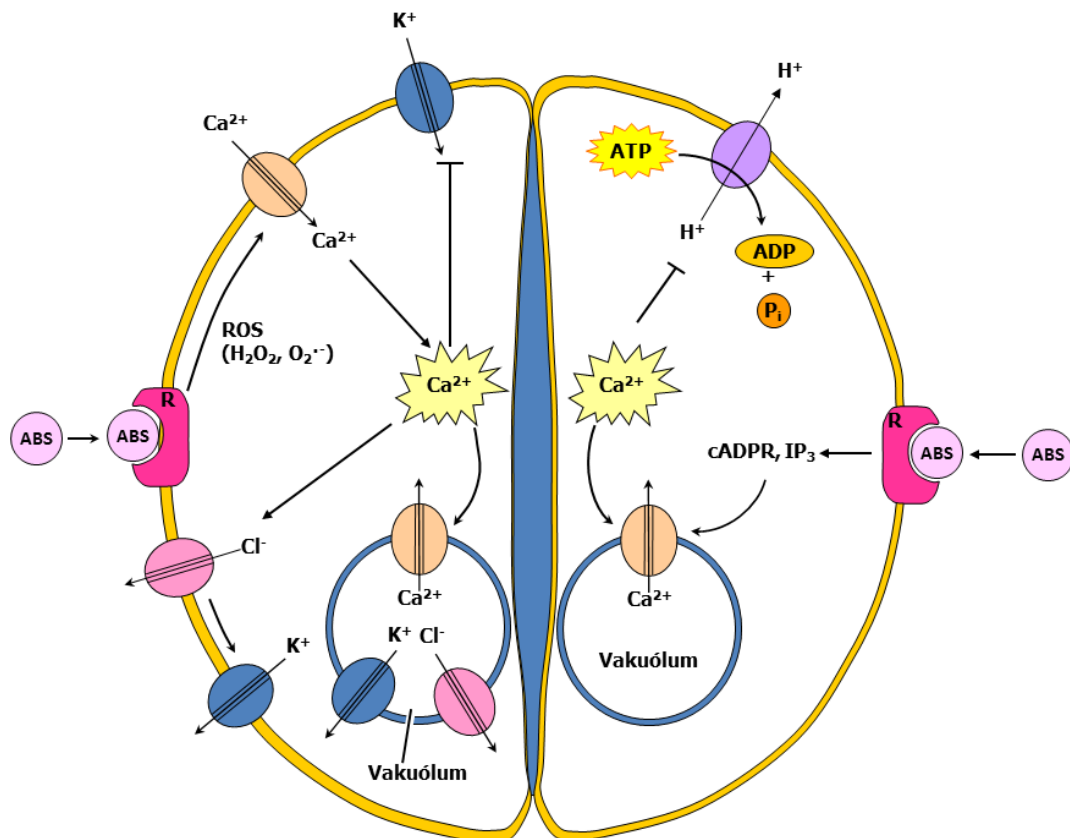
A sztómazáródás során a zárósejtek turgora az ion effluxot követő vízkiáramlás következtében csökken. Az ion efflux legfontosabb komponense a kálium árama, melyet a plazmamembránba ágyazódó, kifelé egyenirányító, feszültség-függő káliumcsatornák közvetítenek az apoplaszt felé. A kálium csatornák mellett az S-típusú, lassú anion efflux csatornák is aktiválódnak, melyen  $\text{Cl}^-$  és malát<sup>2-</sup> anionok szabadulnak ki a sejtől. A sztómazáródáshoz mindemellett az ion influx redukciójára, így a befelé egyenirányító kálium csatorna és a  $\text{Cl}^-$ - $\text{H}^+$ -szimporter deaktivációjára is szükség van (3. ábra; sztómazáródás).

#### *A sztómazáródás $\text{Ca}^{2+}$ -függő regulációja*

A zárósejt transzport-rendszereinek szabályozása az abszcizinsav (ABS) sztómazáró hatásának felderítésével részben tisztázódott. Az ABS hozzáadásával rövid ideig tartó pozitív töltésbeáramlást és tranziens membrán depolarizációt figyeltek meg. Ezzel párhuzamosan a citoplazma  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációja ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) megemelkedett, így bizonyossá vált, hogy a plazmamembrán  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornái aktiválódtak [44]. A citoszol szabad  $\text{Ca}^{2+}$  szintjének emelkedéséhez hozzájárul a sejt belső raktáraiból felszabaduló  $\text{Ca}^{2+}$  is. A növényi sejt legnagyobb  $\text{Ca}^{2+}$  raktárai a vakuólum és az endoplazmatikus retikulum (4. ábra).

A sztómazáródás során a kálium transzport irányultságának hangsúlya az influxról az effluxra tevődik át, melyhez a PM  $\text{H}^+$ -ATPáz aktivitásának csökkenése és a befelé egyenirányított kálium áram ( $I_{\text{Kin}}$ ) redukciója szükséges. A záródás során a citoplazma növekvő  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációja pontosan ezt eredményezi, ugyanis patch clamp vizsgálatok megmutatták, hogy a befelé egyenirányító, feszültségfüggő  $\text{K}^+$ -csatorna a növekvő  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  hatására inaktiválódik [45], és a PM  $\text{H}^+$ -ATPáz aktivitása is csökken [46]. A kifelé egyenirányító  $\text{K}^+$ -csatorna  $\text{Ca}^{2+}$ -függetlennek bizonyult [47] (4. ábra).

A gyors, tranziens depolarizáció nem elég a hosszú membrán-depolarizációra aktiválódó,  $K^+$  efflux csatornák nyitódásához [48]. A hosszú membrán-depolarizációt a plazmamembrán S-típusú anion csatornáinak működése eredményezi, melyen a  $Cl^-$  és a malát $^{2-}$  ionok kiáramlanak. Az anion csatorna  $Ca^{2+}$ -függő, a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  emelésével aktiválódik [49].

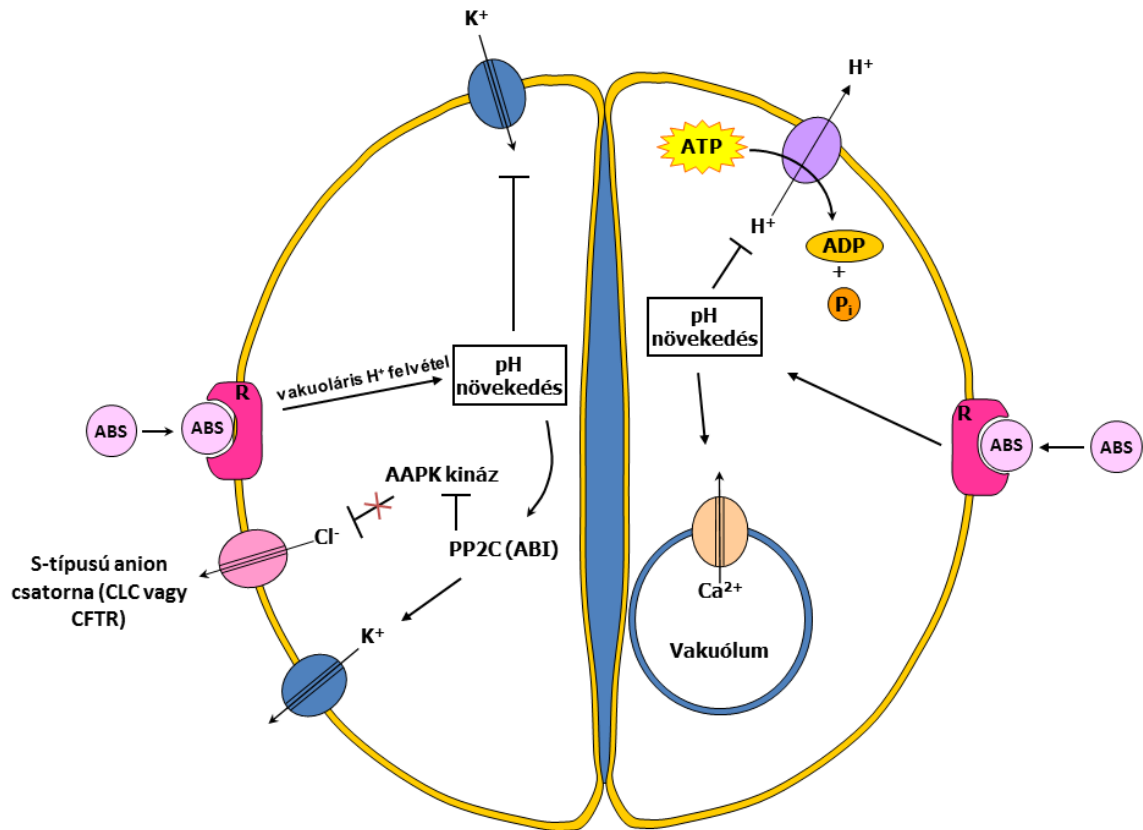


4. ábra A sztómazáródás  $Ca^{2+}$ -függő regulációja. A sztómazáródás során először a PM  $Ca^{2+}$  csatornái aktiválódnak, majd a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  növekedése a belső raktárakból történő további  $Ca^{2+}$  felszabadulást indukál. A jelentősen megemelkedett  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  ezután inaktíválja a PM  $H^+$ -ATPáz és  $K_{in}$  csatornákat, majd anion csatornák aktivációján keresztül, a  $K_{out}$  ioncsatornák aktivációjához is hozzájárul.

#### A sztómazáródás pH-függő regulációja

Kísérleti tapasztalatok szerint, az abszcizinsav a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  emelése mellett a citoszol pH-ját ( $pH_i$ ) lúgos irányban módosítja. A plazmamembrán kálium csatornáit megvizsgálva kiderült, hogy mind a befelé, mind pedig a kifelé egyenirányító ioncsatornák pH-függőek.

Különböznek viszont abban, hogy míg a befelé egyenirányító  $K^+$ -ioncsatorna a lúgosodó citoszol hatására inaktiválódik, addig a kifelé egyenirányító aktiválódik. Az ABS-függő citoszol lúgosodás során tehát a befelé transzportáló kálium ioncsatornák inaktiválódnak, így a sejt kálium tartalma tovább nem növekedhet (5. ábra).



5. ábra A sztómazáródás pH-függő regulációja. A citoplazma pH-jának növekedése elsősorban a vakuoláris ATPázok (V-ATPázok) működése révén valósul meg. A citoplazma lúgosodása meggátolja a PM  $H^+$ -ATPáz és  $K_{in}$  ioncsatornák működését, másrészt a protein foszfatáz 2C (PP2C) működése révén aktiválja a  $K_{out}$  ioncsatornákat és az ABS-aktivált protein kinázok (AAPK) gátlása révén megszünteti az S-típusú anion csatornák inaktivációját.

A lúgosodás másik következményeként a kifelé transzportáló kálium csatornák aktiválódnak, és a sejt kálium koncentrációja csökkenni kezd. A citoszol folyamatosan csökkenő kálium koncentrációját a vakuólum fedezi. Mivel az ABS hatására emelkedő  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  inaktiválja a PM  $H^+$ -ATPázát, a citoplazmatikus lúgosodás ezzel nem magyarázható. Feltételezések szerint az ABS hatására a tonoplaszt elektrogén ionpumpái, a V-ATPáz és a  $H^+$ -pirofoszfatáz ( $H^+$ -PPáz) serkentődnek [50].

---

*A protein foszforiláció szerepe*

A protein kinázok és foszfatázok sztómaregulációban betöltött szerepét az az egyszerű *patch-clamp* kísérlet világította meg, melyben a zárósejt protoplasztokhoz illesztett *patch* pipetta töltőoldatából kihagyták az ATP-t. Ekkor a whole-cell üzemmódban vizsgált protoplasztok S-típusú anion csatornái deaktiválódtak, míg az ATP koncentráció emelésével erőteljes aktiváció volt megfigyelhető. Mivel az aktivációt protein kináz inhibitorokkal meg lehetett szüntetni, az S-típusú anion csatorna fehérjéit bizonyosan a hozzájuk kovalensen kötődő foszfátcsoporthoz hozza aktív állapotba [51]. A protein foszfatázok ezzel szemben a kovalensen kapcsolódó foszfátcsoporthoz eltávolítják, a proteint deaktiválják. Ebből következően, a protein foszfatázok inhibitorai még ATP jelenléte nélkül is aktív állapotban tartják a csatornát, melynek bizonyítékát a protein foszfatáz inhibitor, okadainsav szolgáltatja [49].

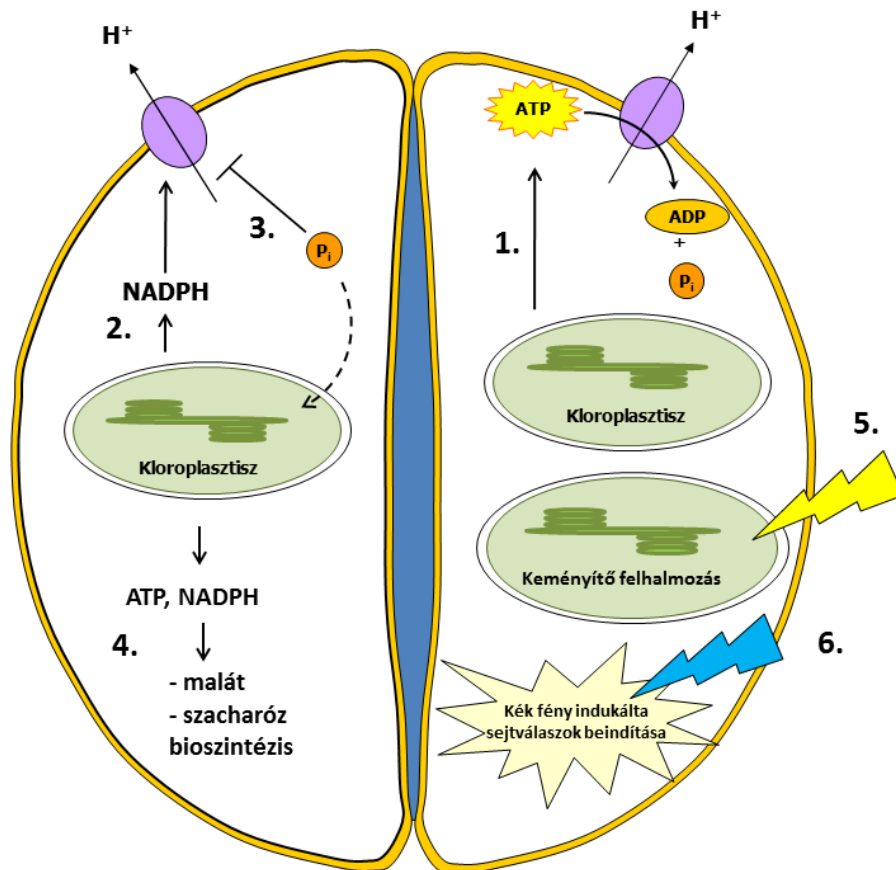
További protein foszfatáz és kináz gátlószerek alkalmazásával sikerült bizonyítani a kalcium-kalmodulin-függő protein foszfatáz 2B (kalcineurin, PP2B) [52-54], a protein foszfatáz 1 és 2A (PP1/PP2A) [55, 56], a  $Ca^{2+}$ -függő protein kinázok (CDPK) [57] és az AAPK-k [58] sztómamozgásokban betöltött szerepét is. A legtöbb esetben a különböző típusú foszfatázok és kinázok egymás mellett, egymás hatását kiegészítve működnek, így nem meglepő, hogy a jelátviteli rendszerben betöltött szerepük alapján a sztómamozgások pozitív vagy negatív regulátoraiként lehet őket említeni.

A PTI során zárósejtekben is sikerült azonosítani specifikusan megjelenő mitogén-aktivált protein (MAP) kaszkádokat. A MAMP indukálta védekezési válaszok során *Arabidopsis thaliana* zárósejtjeiben a MAPK-kináz-kinázok (MPK) közül a *MPK9* és a *MPK12* gének jelentős expresszióját írták le [59].  $H_2O_2$  felszabadulás hatására a MAPK-kinázok (MKK) közül a *MKK4* és *MKK5*, míg a MPK-k közül a *MPK3* és *MPK6* génjei mutattak expresszió növekedést [60, 61].

#### **2.4. A SZTÓMAMOZGÁSOK ÉS A ZÁRÓSEJTEK FOTOSZINTETIKUS AKTIVITÁSÁNAK KAPCSOLATA**

A legtöbb növényfaj zárósejtjeiben találhatunk kloroplasztiszokat [62]. Azonban, míg a mezofillum sejtek esetében átlagosan 70-100 db kloroplasztiszt figyelhetünk meg, addig a legtöbb növényfaj esetében csak 10-15 db-t találunk zárósejtenként (pl. *Vicia faba*) [63]. Egyes esetekben a zárósejtek kloroplasztiszainak száma akár a százat is elérheti (*Polypodium vulgare*) [64], míg speciális esetekben a kloroplasztiszok teljesen

hiányozhatnak is a zárósejtekből (*Paphiopedilum sp*) [65-67]. A zárósejtekből található kloroplasztiszok általában kisebbek, kevésbé fejlettek, és kevesebb gránum tilakoidot tartalmaznak, mint a mezofillum sejtek kloroplasztiszai [68, 69]. A legnagyobb különbség mégis az, hogy pár kivételtől eltekintve (pl. *Arabidopsis sp*, [70]), a zárósejtek kloroplasztiszai sötétben keményítőt halmoznak fel, melyet nappal lebontanak [71].



6. ábra A zárósejtek fotoszintetikus aktivitásának fontossága. A zárósejtek kloroplasztiszainak fontos szerepe van az ATP (1), a NADPH (2), az ortofoszfát ( $P_i$ ; 3) mennyiségének szabályozásában, az ozmotikusan aktív cukrok (4) és a keményítő felhalmozásában (5) valamint raktározásában is (5). Ezen kívül fontos szerepük van a kék fény indukálta jelátviteli folyamatok beindításában egyaránt (6).

A zárósejtek kloroplasztiszai annak ellenére, hogy egyes esetekben vitatott a szerepük, a legtöbb növényfaj esetén a sztómaműködésben kulcsfontosságú sejtalkotónak tekinthetők (6. ábra). Legalább négy olyan, kísérletekkel is alátámasztott tulajdonságot jellemeztek, melyben bizonyítást nyert e funkciójuk [34, 72]:

- A fotoszintézisen keresztül közvetett módon hozzájárulnak a sztómamozgáshoz szükséges energia és redukáló erő, ATP és NADPH formájában történő biztosításához [73, 74].
- Részt vesznek a kék fény érzékelésében, és az arra adott sejtválaszok kialakításában [75, 76].
- Bennük megy végbe a keményítő raktározása [71].
- Hozzájárulnak az ozmotikumként szolgáló cukrok szintéziséhez a fotoszintetikus szénasszimiláció révén [36, 37, 77, 78].

#### 2.4.1 A ZÁRÓSEJTEK FOTOSZINETIKUS AKTIVITÁSÁNAK JELENTŐSÉGE

Számos kutatót foglalkoztatott az a tény, hogy vajon van-e eltérés a mezofillum sejtek és a zárósejtek fotoszintézise között. Ennek tisztázására először a zárósejtekben található kloroplasztiszokat kell tüzetesebben megvizsgálni. A zárósejtekben is megtaláljuk mind az I. (PSI), mind pedig a II. fotokémiai rendszert (PSII), ezenkívül a kloroplasztiszok pigment összetétele is nagyban hasonlít a mezofillum sejtekben megfigyelt arányokhoz. Sikerült bizonyítani, hogy a zárósejtek kloroplasztiszaiban is működik a lineáris elektrontranszportlánc, az oxigénfejlesztés és a fotofoszforiláció is [79-82]. A PSI körüli ciklikus elektrontranszportláncot vizsgálva egyes kutatók arra jutottak, hogy a zárósejtekben ennek szerepe jelentősebb, mint a mezofillum sejtek esetében [83]. Shimazaki és Zeiger [74] kísérletei során viszont ennek az ellenkezőjét bizonyította, miszerint a zárósejtekben mérhető ciklikus elektrontranszportlánc aktivitása nagyjából csak a mezofillum sejtekben megfigyelhető érték 80%-a volt. A kísérletek során kapott ellentmondásokat a Calvin-ciklus napközbeni aktivitásának változásával, illetve az abszorbeált fény minőségének megváltozásával magyarázták [73]. Megfigyelték, hogy megvilágítás hatására CO<sub>2</sub> fixáció nélkül is történhet sztómanyitódás [74], ami azt sugallja, hogy a lineáris elektrontranszport során keletkező ATP és NADPH önmagában is elegendő energetikai háttérrel nyújt a nyitódás folyamatához.

#### 2.4.2. A ZÁRÓSEJTEK KLOROFILL A FLUORESZCENCIA VIZSGÁLATA

A klorofill *a* fluoreszcencia mérés technikájának fejlődésével a kutatók tesztelni és igazolni tudták a zárósejtekben található kloroplasztiszok fotoszintetikus elektrontranszportláncjának működését és a sztómák élettanában betöltött szerepét. Az 1980-as években főleg protoplasztokon, epidermisz nyúzatokon vagy a *Tradescantia albiflora* levelének fehér részein tudtak Kautsky kinetikát vizsgálni, és a kapott adatokból a

Calvin-ciklus működésére következtetni. Cardon és Berry [84] a *Tradescantia albiflora* levelének fehér részein található zárósejtek egyensúlyi fluoreszcencia hozamait vizsgálták különböző CO<sub>2</sub> és O<sub>2</sub> koncentrációk mellett, majd a kapott változások okait a fotokémiai és nem-fotokémiai változásokkal magyarázták. Kísérleteik során arra a megállapításra jutottak, hogy a fotoszintetikus elektrontranszportlánc elsődleges termékei a ribulóz-1,5-biszfoszfát (RuBP) karboxilációja vagy oxigenálódása során használnak fel. Ez volt az első olyan iránymutató közlemény, mely bizonyítékot szolgáltatott a ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz-oxigenáz (Rubisco) általi CO<sub>2</sub> fixációról és a fotorespirációról.

A zárósejtek sejtszintű fluoreszcencia paramétereinek részletesebb jellemzését a telítő fényimpulzusos módszer, az impulzus amplitúdó modulációs fluorimetria és a mikrofluorimetria ötvözése tette lehetővé az 1990-s évek végén. Goh és munkatársai [85] bemutatták a fényadaptált PSII központok maximális kvantumhasznosításának ( $F_v'/F_m'$ ) vizsgálati lehetőségét, amelyből a PSII által elnyelt fotonok energiájának Q<sub>A</sub> redukciójára fordított hányadáról kaphatunk információt. Elvégezték továbbá a zárósejt és a mezofillum protoplasztok klorofill *a* fluoreszcenciájának összehasonlítását is. A lassú fényindukciós (LC) görbék egymáshoz nagyon hasonló lefutást mutattak, utalva a tilakoid membránok hasonló szerkezeti felépítésére. A fő különbség a két sejtípus között abban merült ki, hogy a zárósejtek lineáris elektrontranszportláncának sebessége már alacsony fényintenzitások esetén telítődött. Az első olyan vizsgálat, melyben a zárósejtek és a mezofillum sejtek  $F_v'/F_m'$  paramétereit szimultán vizsgálták Lawson és munkatársai nevéhez [86] köthető. Megállapították, hogy a zárósejtek fotoszintetikus kvantumhatásfoka nagyjából a mezofillum sejtek hatékonyságának a 70-80%-a. Ugyanebben a tanulmányban különböző CO<sub>2</sub> és O<sub>2</sub> koncentrációk között is megvizsgálták a  $F_v'/F_m'$  paraméter alakulását mindkét sejtípus esetében, és igazolták Cardon és Berry [84] állításait, miszerint a fotoszintetikus elektrontranszportlánc elsődleges termékei a ribulóz-1,5-biszfoszfát (RuBP) karboxilációja vagy oxigenálódása során használnak fel.

A legfontosabb kérdés a zárósejtek fotoszintetikus aktivitásával kapcsolatban azonban még mindig az, hogy vajon tudnak-e önállóan elegendő energiát termelni illetve ozmotikumot szintetizálni a sztómaműködés kivitelezéséhez. A kérdésre a választ Lawson [87] összefoglalójában találjuk meg. Egy zárósejt átlagos klorofill tartalma csak 2-5%-a egy átlagos mezofillum sejtének, és térfogata is csak nagyjából egy mezofillum sejt 10%-át teszi ki. Ezeket figyelembe véve Lawson [87] rámutatott, hogy a zárósejtek CO<sub>2</sub>



asszimilációja valahol a mezofillum sejtek CO<sub>2</sub> asszimilációjának 10 és 33% között lehet, ami pedig feltehetően elégséges a sztómamozgások szükségleteinek kielégítéséhez.

## **2.5. A NO ÉS A REAKTÍV OXIGÉN FORMÁK (ROS), MINT JELÁTVIVŐ MOLEKULÁK SZEREPE A SZTÓMAMOZGÁSOK ÉS A MAMP-INDUKÁLTA VÉDEKEZÉSI VÁLASZOK KIALAKÍTÁSÁBAN**

### *2.5.1. A NO ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE*

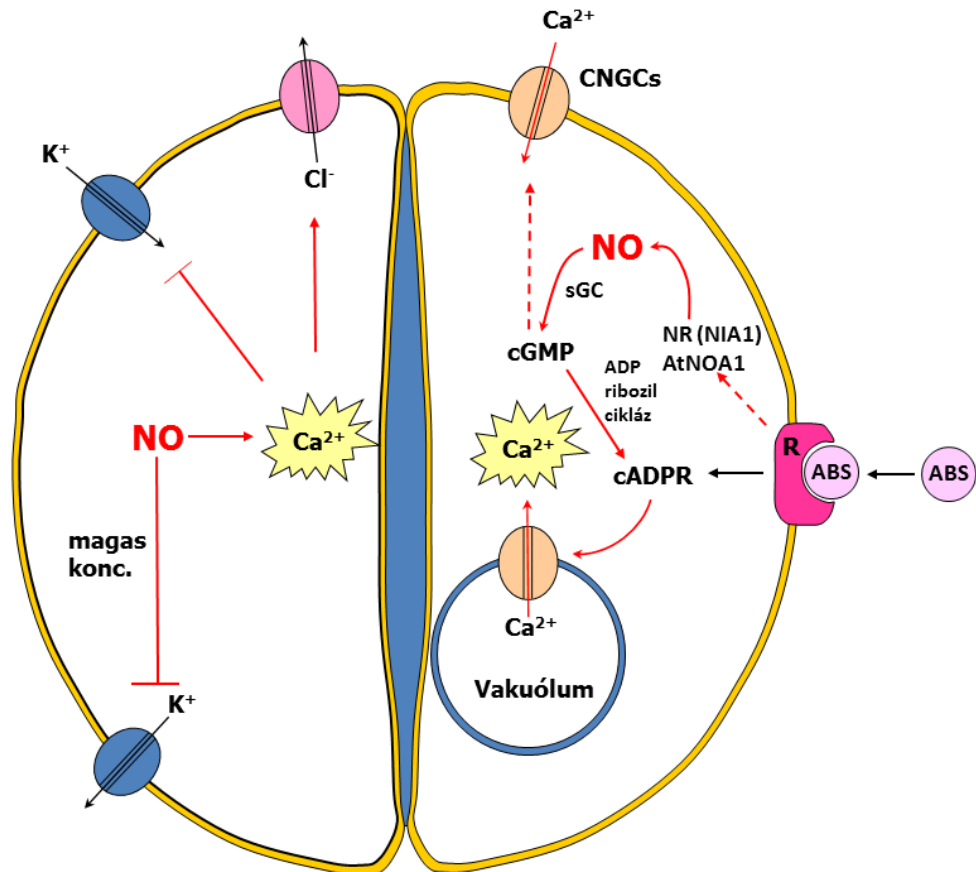
A NO gáz halmazállapotú kétatomos molekula. Kis molekulatömege és apoláros tulajdonsága révén gyorsan diffundál a biológiai membránokon keresztül, ugyanakkor kis mértékben vízdékony is, mely biztosítja a NO szignál gyors terjedését a sejtek kompartmentumai és a szomszédos sejtek között [88]. A NO féléletideje a saját és a vele reakcióba lépő anyagok jellegének és koncentrációjának függvényében néhány másodperc és több perc között változhat [89]. A viszonylag hosszú féléletidő és kémiai tulajdonságai együtt teszik lehetővé a NO számára, hogy sejt szinten nagy távolságokban közvetítsen jelet. Könnyen reagál vízzel, oxigénnel, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal, szuperoxid gyökionnal (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), fehérjék tiol oldalláncáival és különböző átmeneti fémekkel. Másrészt a NO szabadgyök molekula (NO<sup>•</sup>), a környezet redoxállapotának függvényében könnyen oxidálódhat nitrozónium kationná (NO<sup>+</sup>) vagy redukálódhat nitroxil-anionná (NO<sup>-</sup>), melyek biológiai hatásai eltérőek, sőt olykor egymással ellentétesek is lehetnek [90, 91].

A NO kutatásával a múlt század vége óta egyre több kutatócsoport foglalkozik, így ennek köszönhetően sikerült bizonyítani a növények legkülönbözőbb anyagcsere- és fejlődési folyamataiban betöltött szerepét. Részt vesz többek között a sztómazáródásban, a csírázásban, gyökérfejlődésben, a virágzás indukciójában, és fontos szerepet tölt be az abiotikus [92, 93] és a biotikus stresszválaszok kialakításában is. A NO szerepet játszik a *Pseudomonas syringae* elleni védekezési válasz kialakításában [94-96], az árpa lisztharmat és a köles peronoszpórák fertőzésének kialakításában [97, 98] vagy az *Arabidopsis thaliana* *Botrytis cinerea* elleni védekezésében [99]. Jól látható tehát, hogy NO kulcsfontosságú szerepet tölt be a PTI indukálásában. Ezek után nem meglepő az a tény, hogy számos patogén képes olyan effektor molekulák szintézisére, melyek képesek kioltani a NO indukálta válaszfolyamatokat. Ilyen folyamat figyelhető meg például az *Erwinia chrysanthemi* esetében is, mely során olyan flavohemoglobinok szintézise történik meg, melyek a NO-t nitráttá (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) alakítják át [100]. A NO bioszintézise máskor viszont akár hozzá is járulhat a patogének kulcsfontosságú infekciós struktúráinak kialakításához. Azt is

meg kell viszont említeni, hogy a NO nem csak a patogén támadás során kulcsfontosságú, hanem fontos szerepe van a szimbiotikus kapcsolatok kialakításában is [101]. Így ezek alapján jogosan vetődik fel a kérdés, hogy vajon hogyan képes a NO az egymásnak ellentmondó folyamatokban szerepelni. Ugyanis részt vesz a PTI és a védekezési válaszreakciók kialakításában, képes a HR kiváltására, valamint képes a szimbiózisok kialakulását elősegíteni. Hogy mi állhat ezen ellentmondásos hatások hátterében jelenleg még nem ismert, azonban feltételezhetően az eltérő folyamatok indukciójáért a NO koncentráció-függő hatásmechanizmusa tehető felelőssé [102, 103].

A NO MAMP érzékelés során és a PTI-ben betöltött szerepén kívül igen fontos résztvevő a sztómaműködés szabályozásának jelátvitelében is [104]. A NO-ról viszonylag korán kiderült, hogy része az ABS jelátviteli rendszernek [105]. Az ABS indukálta citoplazma lúgosodás és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> együttes hatása révén indukálódik a NO termelődése [106]. A keletkezett NO fém nitroziláció révén aktiválja a citoplazmában található szolubilis guanilat cikláz (sGC), ami a működése során a guanidin-monofoszfátot (GMP) ciklikus guanidin-monofoszfáttá (cGMP) alakítja át. A cGMP a ciklikus nukleotidkapuzott Ca<sup>2+</sup> ioncsatornák (CNGC-típusú) aktiválása révén megemeli a citoplazma Ca<sup>2+</sup> koncentrációját [107, 108]. Az ABS jelátvitelétől eltérően a MAMP-k (peptidoglukánok, LPS, xilanáz, kitozán, oomycota elicítinek) észlelése során a NO termelését megelőzően figyelhetjük meg a citoplazma Ca<sup>2+</sup> koncentrációjának megemelkedését [109-113]. Mind az ABS-, mind pedig a MAMP indukálta jelátvitel során a megemelkedett citoplazmatikus Ca<sup>2+</sup> koncentráció a K<sup>+</sup> ioncsatornák közvetlen vagy közvetett gátlása (K<sup>+</sup><sub>in</sub>) vagy aktiválása (K<sup>+</sup><sub>out</sub>) révén sztómazáródást idéz elő.

Érdekes módon a NO koncentráció-függő hatása a sztómamozgások esetében is megfigyelhető. Alacsony koncentráció esetén záródást, míg magas koncentrációban alkalmazva sztómamanyitódást indukál [114]. Ezt a megfigyelést Sokolovski és Blatt [115] a nagy koncentrációban alkalmazott NO esetén K<sup>+</sup><sub>out</sub> ioncsatornákon végzett patch clamp vizsgálatokkal igazolni tudta, ugyanis a NO feltételezhetően valamilyen poszttranszlációs módosításon keresztül inaktiválta az ioncsatornát (7. ábra).



7. ábra A NO szerepe a sztómaműködés szabályozásában. A NO közvetve a citoplazmatikus  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció növelésével, vagy pedig közvetlenül az egyes ioncsatornák fehérjéinek posztranszlációs módosításain keresztül képes a sztómamozgások szabályozására.

#### 2.5.2. A NO KELETKEZÉSE A ZÁRÓSEJTEKBEN

A NO forrása a növényekben a mai napig tisztázatlan, így a zárósejtek esetében is sok ellentmondásos eredmény született a NO bioszintézisével kapcsolatban. Egyaránt sikerült enzimatikus és nem-enzimatikus utak jelenlétét is igazolni.

A nem-enzimatikus utak egyike során a nitrit ( $\text{NO}_2^-$ )-NO átalakulás figyelhető meg a kloroplasztiszokban aszkorbinsav jelenlétében alacsony pH mellett [88]. Illetve Cooney és munkatársai [116] megfigyelték, hogy egyes karotinoidok fény hatására képesek a  $\text{NO}_2^-$ -NO reakció katalizálására.

Az ismert enzimatikus útvonalak közül zárósejtekben a nitrát-reduktáz (NR) és egy ismeretlen nitrogén-monoxid szintáz-szerű (NOS-szerű) enzim szerepét sikerült igazolni.

Jasid és munkatársai [117] szója kloroplasztiszokban mutatták ki egy, az állati NOS-hoz hasonló útvonal megfelelő körülmények (NADPH és megfelelő mennyiségű arginin jelenlétében) melletti megjelenését. Azonban egyre elfogadottabb az a tény, hogy a NO fő forrása zárósejtek esetében a NR-hoz kapcsolható  $\text{NO}_2^-$  redukció.

A NR szerepét igazolták a MAMP-k [118, 119], a szárazság [120], a hideg [121] és a sztómamozgások [106] során keletkező NO szintézisében. A NR egy molibdén tartalmú enzim, mely NADPH jelenlétében a  $\text{NO}_2^-$ -t NO-dá képes redukálni, de akár peroxinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) képzésére is képes [122]. *Arabidopsis thaliana*-ban két gén kódolja a NR-t, a *NIA1* és a *NIA2*, melyek közül a zárósejtek esetében a *NIA2* jelentősebb expressziót mutat.

A NR nagy affinitású szubsztátja a  $\text{NO}_3^-$  ( $K_m$  nitrát  $\ll$  40  $\mu\text{M}$ ), míg az alacsony affinitású szubsztátja a  $\text{NO}_2^-$  ( $K_m$  nitrit = 100  $\mu\text{M}$ ), ebből jól látható, hogy fiziológias körülmények között a NO  $\text{NO}_2^-$ -ből való keletkezésének valószínűsége csekély. A  $\text{NO}_2^-$  redukciójához fiziológiásan magas  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  arány szükséges. Ezt a  $\text{NO}_3^-$  vakuólumba történő influxával vagy az extracelluláris térbe történő effluxával tudja a sejt biztosítani. *Arabidopsisban* a vakuólumba történő szállításért az AtCLCa antiporter a felelős, mely 1  $\text{H}^+$  citoplazmába jutása révén képes 1  $\text{NO}_3^-$  molekulát a vakuoláris térbe juttatni. A transzport energiaigényét a citoplazma pH változására aktiválódó V-ATPázok és V-PPázok biztosítják [50]. A  $\text{NO}_3^-$  vakuoláris raktározása révén a citoplazma  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  aránya a kiindulási érték 50-szeresére is emelkedhet, ami lehetővé teszi a NR általi  $\text{NO}_2^-$ -NO átalakulást. A  $\text{NO}_3^-$  anionok sejten kívülre juttatásának szerepét a cryptogein hatására indukálódó HR során írták le. A  $\text{NO}_3^-$  efflux során a citoplazma  $\text{NO}_3^-$  tartalma a kiindulási értékhez képest körülbelül 60%-kal csökkent le, ami szintén lehetővé tette a NR általi  $\text{NO}_2^-$ -NO átalakulást [123].

### 2.5.3. A ROS ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE

A ROS-k az oxigén nem teljes redukálódása révén keletkező speciális vegyületek. A legfontosabb képviselőik a  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a szingulett oxigén ( $^1\text{O}_2$ ) és a hidroxil gyök ( $\text{OH}^{\cdot}$ ). A különböző ROS-k sokáig csak mint mérgező és nem kívánatos molekulák szerepeltek a kutatók tudatában, azonban ma már tudjuk, hogy az oxidatív stressz kialakításán kívül jelentős szerepet töltenek be különböző komplex jelátviteli és anyagcsere útvonalakban egyaránt [124, 125]. A ROS szerepe bizonyítást nyert a PTI és a védekezési válaszok során [126], a növekedés és fejlődés során [60], a sejthalál indukciójának elősegítésében [127] és a zárósejtek működésének szabályozásában is [128].

### 2.5.3.1. A $H_2O_2$ szerepe a zárósejtekben

A  $H_2O_2$  tulajdonságai (hosszú féléletidő, membrán diffuzibilitás) alapján kiváló jelátviteli komponensnek tűnik. A tulajdonságai alapján a  $H_2O_2$ , mint jelmolekula alkalmas a hosszú távú, sejtek közötti kommunikációra is, ezáltal fontos szerepet tölt be az úgynevezett szisztemikus védekezési válaszok (SAR) kialakításában.

Miao és munkatársai [129] *Vicia faba* esetén igazolni tudták, hogy az ABS kezelés hatására  $H_2O_2$  bioszintézis fokozódás történik, ami a  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  emelkedésén keresztül végül sztómazáródást indukált. Srivastava és munkatársai [106] kimutatták, hogy a kitozán kezelés hatására a borsó növények zárósejtjeiben aktiválódó PTI során a  $H_2O_2$  az egyik legkorábban megjelenő jelátviteli komponens. Ha a  $H_2O_2$ -t kioltották, a sztómazáródás elmaradását figyelték meg, ezzel bizonyítva a  $H_2O_2$  sztómazáródásban betöltött szerepét.

### 2.5.4. A ROS BIOSZINTÉZISE

A NO-dal ellentétben a ROS-k keletkezése már jól ismert enzimatikus és nem enzimatikus folyamatokat foglal magában. A ROS-k keletkezési helyei növényekben elsősorban a kloroplasztiszokhoz ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $^1O_2$ ), a mitokondriumokhoz ( $O_2^{\cdot-}$ ), a peroxiszómákhoz ( $H_2O_2$ ) vagy a plazmamembrán NADPH oxidoreduktáz enzimének működéséhez ( $O_2^{\cdot-}$ ) köthetők. Általánosságban kijelenthető, hogy zárósejtek esetében a különböző környezeti behatások esetén a különböző ROS-k elsősorban a kloroplasztiszokban és a mitokondriumokban keletkeznek. Stressz behatás esetén, erős megvilágítás mellett nagyobb mennyiségű  $^1O_2$  termelődés mutatható ki a PSII reakciócentrumokban, mikor a triplétt állapotú  $P_{680}$  klorofill molekulák a gerjesztési energiájukat molekuláris oxigénnek adják át [130, 131]. Az  $O_2^{\cdot-}$  és a  $H_2O_2$  a Mehler-reakció során keletkeznek, melyet más néven víz-víz ciklusnak is neveznek. A Mehler-reakció során a vízbontásból származó elektronok az elektrontranszportláncon végighaladva a ferredoxinról molekuláris oxigénre kerülnek,  $O_2^{\cdot-}$ -t létrehozva. A keletkezett  $O_2^{\cdot-}$ -t a szuperoxid-dizmutázok  $H_2O_2$ -á alakítják át, a  $H_2O_2$  pedig az aszkorbát-peroxidáz enzim közreműködésével a folyamat végén vízzé redukálódik [132]. Ezen kívül erős fény hatására a PSII környezetében a  $O_2^{\cdot-}$ , a  $H_2O_2$  és a  $OH^{\cdot}$  megjelenése is detektálható [133, 134].

Az ABS érzékelését követően jelentős ROS, elsősorban  $H_2O_2$  termelődés figyelhető meg. Zhang és munkatársai [135] az ABS-indukált  $H_2O_2$  forrásaként a kloroplasztiszokat

és a PM-lokalizált NADPH-oxidázt jelölték meg. Kwak és munkatársai [136] kimutatták, hogy az ABS indukálta sztómazáródásban a NADPH-oxidáz két alegységét kódoló génnek, az *AtrbohD*-nek és az *AtrbohF*-nek, kitüntetett szerepe van, ugyanis mutációjuk során elmaradt az ABS indukálta sztómazáródás. A NADPH-oxidáz mellett egyéb enzimatis utakat is feltártak, mint például a sejtfa-kötött peroxidázok vagy a réz-amin-oxidáz, melyek szintén fontos szerepet töltenek be mind a SAR, mind pedig a sztómazáródás szabályozásában [137].

#### 2.5.5. A NO ÉS A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> SZEREPE A FEHÉRJÉK POSZTTANSLÁCIÓS MÓDOSÍTÁSÁBAN (PTM)

A NO-által szabályozott egyik leggyakoribb PTM az S-nitroziláció, mely során a NO és a cisztein tartalmú fehérjék vagy oligopeptidek tiol-csoportja között reverzibilis reakció történik. Az S-nitrozilálásnak szerepe lehet a fotoszintetikus elektrontranszportlánc és a Calvin-ciklus szabályozásában, a redox egyensúly fenntartásában, az anyagcsere útvonalakban és a stresszválaszokban szereplő fehérjék aktiválásában vagy deaktiválásában egyaránt. A folyamat reverzibilitását az S-nitrozoglutation-reduktáz biztosítja, mely az S-nitrozilált fehérjék tiol-csoportjait egy transznitrozilációs reakció során egy redukált glutation felhasználásával redukálja. A reakció során egy S-nitrozoglutation (GSNO) is felszabadul, mely önmaga is egy fontos endogén NO raktározó molekula [138].

A NO-függő PTM-k egy másik típusa a tirozin-nitráció. A NO O<sub>2</sub><sup>-</sup>-al reagálva ONOO<sup>-</sup>-t képez, mely képes a fehérjék tirozin oldalláncainak nitrálására, 3-nitrotirozin oldalláncokat kialakítva. A folyamat irreverzibilis, és a tirozin nitráción átesett fehérjék esetében a reakció általában az adott fehérje vagy enzim funkcióvesztésével párosul.

A fém nitráció során a NO nem közvetlenül a fehérjék oldalláncával, hanem a fehérjékben található átmenetifémekkel lép kölcsönhatásba. Fém nitrációval módosulhatnak többek között különböző vas-kén tartalmú fehérjék is, mint pl. a mitokondriális és fotoszintetikus elektrontranszportlánc átmenetifém tartalmú enzimeik.

A szulfoniláció a fehérjék cisztein oldalláncainak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-általi poszttanszlációs módosulása. A szulfonilálás biológiai szerepét a szimbiotikus kapcsolatok kialakításáért és működőképességének fenntartásáért felelős fehérjék esetében sikerült már bizonyítani. Ezen kívül fontos szerepe van még a nitrogén fixálás enzimeinek aktivitás szabályozásában is [139]. Ezenkívül a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a cisztein oldalláncok oxidációja révén a proteinek

foszforilációját is szabályozhatja, mely fehérje diszulfid hidak kialakulását segíti elő, ezáltal nehezítve vagy meggátolva a protein foszfatázok és kinázok a fehérjéhez történő hozzáférését [140, 141]. A célfehérjék lehetnek protein foszfatázok, MPK-k és kalciumfüggő protein-kinázok (CPK) egyaránt.

#### 2.5.6. A NO FOTOSZINTÉZISRE GYAKOROLT HATÁSA

A NO fotoszintetikus elektrontranszportláncra gyakorolt hatását a legegyszerűbben külsőleg adagolt NO használatával lehet vizsgálni. Ezt kétféleképpen lehet kivitelezni. Az egyik lehetőség a NO-t a növények környezetébe gáz formájában juttatni, és így vizsgálni a növényekre gyakorolt hatásokat [142-144], a másik pedig különböző mesterséges NO források használata. A legismertebb és legszélesebb körben alkalmazott donor molekulák a nátrium-nitroprusszid (SNP), a GSNO és az S-nitrozo-acetilpenicillamin (SNAP). Azonban azt is meg kell említeni, hogy mindkét módszernek vannak előnyei és hátrányai is. A NO gáz levegővel érintkezve könnyen és gyorsan NO<sub>2</sub>-dá alakul. A donorok alkalmazása során pedig nem lehet tudni, hogy a donorból az adott körülmények között mennyi NO szabadul fel, és azt sem, hogy ebből mennyi jut le az általunk vizsgálni kívánt célterületre. A NO donorok használata során ugyanis több kutatócsoport sokszor ugyanazon donorok alkalmazása mellett, hasonló körülmények között, különböző, olykor egymásnak teljesen ellentmondó eredményeket kapott [91, 145-147].

NO gáz használatával bizonyították, hogy alkalmazása csökkenti a zab és a lucerna levelek CO<sub>2</sub> fixációját [148]. Ehhez hasonlóan később Saxe [149] is megállapította, hogy a NO további nyolc növény faj esetében is csökkenti a fotoszintetikus aktivitást. A korábbi eredményekkel ellentétben viszont Jin és munkatársai [150] úgy találták, hogy a NO gáz jelentősen növelte a spenót növények fotoszintetikus aktivitását.

##### 2.5.6.1. A NO hatása a fotoszintetikus elektrontranszportláncra

A NO szabályozó, gátló szerepét a lineáris elektrontranszportlánc több pontján is igazolták. Takahashi és Yamasaki [151] igazolta, hogy a NO izolált tilakoid membránok esetében gátolja a lineáris elektrontranszportláncot, lassítja a sztróma és a lumen közötti pH különbség felépülését, ezáltal pedig jelentősen lassítja a fotofoszforilációs események kialakulását. Az izolált tilakoid membránokon [152, 153], majd pedig később az intakt borsó leveleken [147] végzett kísérletek igazolták, hogy a NO lassítja a Q<sub>A</sub> és Q<sub>B</sub> közötti elektronátadást, valamint meggátolja a Q<sub>A</sub> és a PSII vízbontó komplexének S<sub>2</sub> állapota

közötti töltésrekombinációs események kialakulását. Wodala és munkatársai [147, 154] továbbá azt is kimutatták, hogy a NO koncentráció-függő módon csökkenti a nem-fotokémiai kioltás (NPQ) és annak energiafüggő kioltási komponense ( $qE$ ) mértékét. Továbbá Abat és munkatársai [155] bizonyították, hogy a NO a Rubisco enzim S-nitrozilációján keresztül, koncentráció-függő módon lassíthatja a fotoszintézist.

Vladkova és munkatársai [156] szerint a NO donorok közül az SNP az egyetlen, mely a PSII-n belüli elektronátadások gyorsításán keresztül képes a lineáris elektrontranszportlánc működésének serkentésére. Hipotézisük szerint ennek hátterében a NO és a D2 fehérje  $Y_D$  tirozinja közötti reakciója állhat, létrehozva az  $Y_D\cdot$ -NO gyökpárt, mely alacsonyabb redoxpotenciálja miatt, izolált tilakoid membránok esetében hatásosabb elektronodonornak bizonyult, mint a D1 fehérjén található  $Y_Z$  tirozin.

Érdekes módon a NO a PSI esetében annak ellenére sem okoz jelentős gátlást, hogy a PSI elektron továbbító rendszerében sok Fe-S centrumot találhatunk. Wodala és munkatársai [154] véleménye szerint a NO nem befolyásolja a PSI elektrontranszportját. Azonban borsó növények leveleinek GSNO-kezelése során azt tapasztalták, hogy a NO-kezelés hatására a lineáris elektrontranszportlánc elektronkészletben egy kis mértékű emelkedés volt megfigyelhető, melynek hátterében a PSI körüli ciklikus elektrontranszport mérsékelt serkentése állhat.

#### 2.5.7. A ROS HATÁSA A FOTOSZINTÉZISRE

A ROS egyik fő forrása zárósejtekben is a kloroplasztiszokban, a fotoszintetikus elektrontranszportláncához köthető. Fénystressz hatására kimutathatóan megemelkedik a  $O_2\cdot^-$ , a  $H_2O_2$ , a  $^1O_2$  és a  $OH\cdot$  mennyisége, ami fotoinhibícióhoz vezet. A fotoinhibíció során a ROS-k elsődleges célpontja a D1 protein. A különböző ROS-k, a hatékony növényi védekezési mechanizmusok kimerülését követően a D1 protein donor és akceptor oldali károsodását is okozhatják. A különböző ROS molekulák ezen kívül a fotoszintetikus pigmentek és fehérjék degradációjával vagy a tilakoid membránok lipidperoxidációján keresztül a fénybegyűjtő komplexeket is károsíthatják. Továbbá a ROS-k gátolhatják a Calvin-Benson ciklusban szereplő enzimeket is, ezzel tovább rontva a fotoszintézis hatékonyságát.



### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánkban az egyik legáltalánosabb gomba MAMP, a kitozán sztómaműködésre gyakorolt hatását vizsgáltuk lóbab (*Vicia faba* L.) modellnövényben. A kitozán a sejtmembrán számára átjárhatatlan, hatását így feltehetően csak a sejtfelszíni receptorokon keresztül képes kifejteni. Receptorával való kapcsolódása különböző jelátviteli utakat indukálhat, ezért célunk a lehetséges jelátvivő molekulák azonosítása, és azok lehetséges fotoszintézisre gyakorolt hatásának részletes vizsgálata volt.

Az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Vajon a *Vicia faba* zárósejtje képes-e kitozán molekulát, mint MAMP vegyületet felismerni, és hatására bekövetkezik-e sztómazáródás illetve sztómanyitódás-gátlás? Amennyiben igen, akkor vajon a  $H_2O_2$  és NO, mint jelátvivő komponens szerepel-e a kitozán-indukált jelátviteli utak hálózatában? E jelátvivő molekulák mely kompartmentumokban és a kitozán kezelés után mennyi idővel keletkeznek?
2. A zárósejtek környezetében lévő parenchima réteg mezofillum sejtjei vajon befolyásolják-e a kitozán sztómaműködésre gyakorolt hatását?
3. Vajon a kitozán befolyásolja-e a zárósejtek fotoszintetikus aktivitását, ezáltal csökkentve vagy növelve a záródáshoz és nyitódáshoz szükséges ATP és NADPH mennyiségét?
4. Tilakoid membránok és intakt levelek esetében már igazolták, hogy a NO gátolja a PSII donor és akceptor oldali elektronátadási folyamatait. Amennyiben sikeresen azonosítani tudnánk a kitozán indukálta  $H_2O_2$  és NO megjelenését, exogén  $H_2O_2$  és NO-donorok használatával tesztelni szeretnénk ezek fotoszintetikus elektrontranszportláncra gyakorolt hatását zárósejtekben.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. NÖVÉNYNEVELÉS

A kísérleteinkhez lóbab (*Vicia faba* L. cv. Mirna) növényeket használtunk. A 25 (v/v) %-os nátrium-hipoklorit oldattal 15 percig sterilizált magvakat három napig 26 °C-on Petri-csészékbe helyezett nedves szűrőpapíron csíráztattuk, majd a csíranövényeket módosított Hoagland tápoldatban (2 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0,5 mM KCl, 0,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,001 mM  $\text{MnSO}_4$ , 0,005 mM  $\text{ZnSO}_4$ , 0,0001 mM  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ , 0,01 mM  $\text{H}_3\text{BO}_4$ , and 0,02 mM Fe(III)-EDTA, pH 6,0) neveltük tovább 4-5 hétig. A növénynevelés során a kontrollált körülményeket egy Fitoclima S 600 PLH (Aralab, Portugália) növénynevelő klímakamra segítségével biztosítottuk, 12/12 órás nappal/éj ciklus, 25/20 °C-os hőmérséklet és 70%-os relatív páratartalom mellett. A megvilágítás erőssége a levelek szintjén  $120 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  volt.

### 4.2. KÍSÉRLETI OLDATOK ÉS KEZELÉS

A kitozán pH 7 felett vizes közegekben is oldható, de oldhatósága jelentősen növelhető nátrium-acetát pufferekben, savas környezetben [157]. Az alacsony molekulatömegű kitozánt (50-196 kDa,  $\geq 75\%$  deacetilációs fok - Sigma-Aldrich, Magyarország) ezért 100 mM nátrium-acetát pufferben (pH 3,63) oldottuk fel,  $10 \text{ mg ml}^{-1}$  koncentrációban, majd ezt a későbbi kísérletek során törzsoldatként használtuk. A törzsoldat hígítása 10 mM MES, 10 mM KCl és  $100 \mu\text{M CaCl}_2$  tartalmú inkubációs oldattal (pH 6,15 TRIS) történt. A kísérleti oldatban a kitozán végkoncentrációja minden esetben  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  volt. Kontroll oldatként minden esetben 1 mM nátrium-acetát tartalmú inkubációs oldatot alkalmaztunk. A kezeléseket során a 3.-4. levélemeleten található teljesen kifejlett levelek abaxiális epidermiszét ecseteltük vagy permeteztük be a kísérleti oldattal. A kezeléseket annak megfelelően, hogy a sztómanyitódás megakadályozását vagy a záródás indukálást tűztük ki célul, hajnali 4:00 és 5:00 óra között (sztómanyitódás gátlás) vagy délelőtt 10:00 órakor (sztómazáródás indukció) végeztük el. A kontroll növények levelét kitozánt nem tartalmazó inkubációs oldattal ecseteltük vagy permeteztük be.

NO donorként GSNO-t (Sigma-Aldrich, Magyarország) alkalmaztunk. A donor molekulát az inkubációs oldathoz adtuk, majd a GSNO fotolízisét, így a NO felszabadulását  $500 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fehér fényvel való megvilágítással biztosítottuk.

A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal történő kezelések esetén, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t 100 µM végkoncentrációban alkalmaztuk. A 30 %-os tömény H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> törzsoldatot (Reanal, Magyarország) az inkubációs oldattal hígítottuk ki.

#### 4.3. A NO KONCENTRÁCIÓ MEGHATÁROZÁSA

A GSNO oldatban keletkezett NO mennyiségét NO-elektrod (ISO-NOP; World Precision Instruments Inc., USA) segítségével határoztuk meg. Az elektrod kalibrálása során a gyártó által megadott utasításokat követtük, vagyis különböző térfogatú SNAP oldatot csepegtettünk pH 4 kémhatású Cu<sup>2+</sup> oldatba (pH beállítás kénsavval). A NO-t tartalmazó oldat egy gyors oldatcserélő rendszer (ALA Science, USA) segítségével jutott a kísérleti tálkába, amely egy inverz epifluoreszcens mikroszkóp (Zeiss GmbH, Németország) munkaasztalára volt rögzítve.

#### 4.4. SZTÓMA PÓRUSÁTMÉRŐ MEGHATÁROZÁSA

A légrések átmérőjének meghatározásához frissen készített epidermisz nyúzatokat használtunk, majd a nyúzatok random módon kiválasztott területeiről mikroszkóp alatt (Nikon Eclipse TS-100, Nikon Instruments, Japán) felvételeket készítettünk. A digitális felvételeken a pórusátmérőket kalibrációt követően az ImagePro 5 program (Media Cybernetics, USA) segítségével mértük le, és µm egységekben fejeztük ki. Minden kezelés esetében legalább 90 db sztómát vizsgáltunk meg.

#### 4.5. EPIDERMISZ NYÚZATOK ELŐKÉSZÍTÉSE A ZÁRÓSEJTEKEN VÉGZETT MICROSCOPY-PAM MÉRÉSEKHEZ

A kísérleteinkhez 4-5 hetes *Vicia faba* növények 3.-4. levélemeletéről származó teljesen kifejlett levelek abaxiális epidermisz nyúzatait használtuk fel. Annak érdekében, hogy a mezofillum sejtek, vagy a nyúzás során keletkezett mezofillum törmelékből származó klorofill *a* fluoreszcenciát kizárjuk, a fő ereket szikével eltávolítottuk, majd a nyúzatokat 5 percig a hipoozmotikus inkubációs oldaton úsztattuk. A megtisztított nyúzatokat ezután friss inkubációs oldatba helyeztük, ahol a kísérlet megkezdéséig, de nem tovább, mint fél óráig tároltuk őket. A mérések előtt a nyúzatokat egy vékony, fedőlemez aljú Petri-csészébe rögzítettük egy fémháló segítségével. A kísérleti oldatokat (inkubációs oldat, GSNO, kitozán) egy gyors oldatcserélő rendszer használatával jutattuk a sejtek környezetébe.

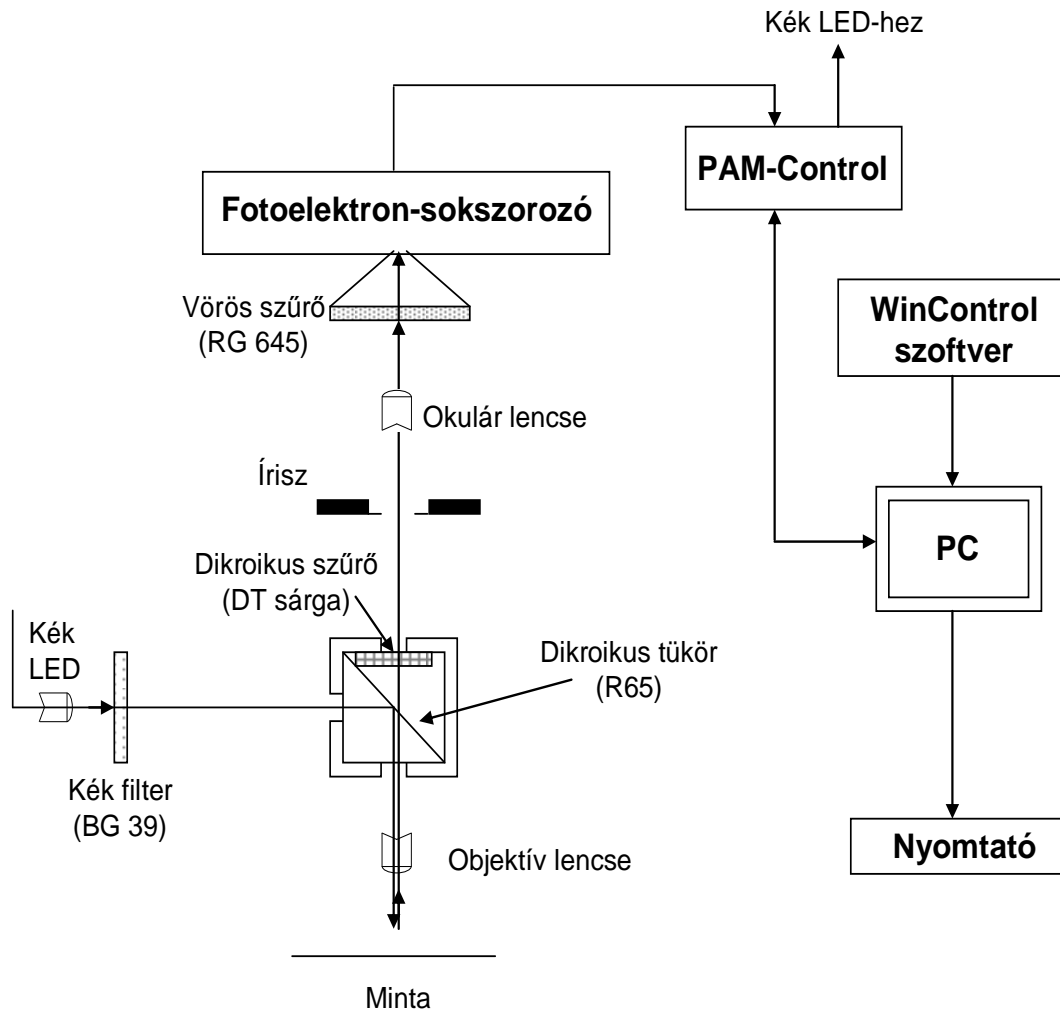
Az ozmotikus sokk okozta esetleges káros hatások kiszűrésére életképességi tesztek végeztünk (neutrál vörös és fluorescein-diacetát festések, Microscopy-PAM), de

sem a festések, sem pedig a fotoszintetikus paraméterek esetében nem volt tapasztalható eltérés a kezelt és a kezeletlen minták között.

Ellenőrzésképpen összehasonlítottuk a különböző helyről származó (3. vagy 4. levélemelet) vagy különböző korú (4 és 5 hetes) levelek zárósejtjeinek fotoszintetikus aktivitását is, azonban eltérést itt sem tapasztaltunk.

#### **4.6. KLOOROFILL A FLUORESZCENCIA MÉRÉSEK MICROSCOPY-PAM FLUORIMÉTER SEGÍTSÉGÉVEL**

A Microscopy-PAM módszer alapja az impulzus amplitúdó modulált eljárás, mely akár egyetlen sejt fluoreszcencia indukciójának rögzítésére is alkalmas. Az elrendezésben (8. ábra) a Microscopy-PAM rendszer egy inverz fluoreszcens mikroszkóphoz (Axiovert 40 CFL, Zeiss GmbH, Németország) csatlakozik. Esszenciális elemei a kék fényemittáló dióda (LED, NSBG 500, Nichia, Japán), mint az impulzus-modulált mérőfény forrása, a miniatűr fotoelektron-sokszorozó (PC/PM-MC, Walz GmbH, Németország) és az órajelet szolgáltató PAM-Control egység (Walz GmbH, Németország). A modulált kék fény először egy kék szűrőn (BG39, Schott, Németország) halad át, majd egy dikroikus tükörről (R65, Balzers, Liechtenstein) visszaverődve az objektív (20X, NeoFluar típusú, Zeiss) segítségével a mintára fókuszálódik. A minta által kibocsájtott vörös fluoreszcens fény az objektíven, a dikroikus tükrön, majd egy második dikroikus szűrőn (DT Sárga, Balzers) a detektor felé halad tovább. A szűrők azt a célt szolgálják, hogy a vörös fluoreszcens fényből kiszűrjék a gerjesztési és/vagy a kék mérőfény maradékát. Tovább haladva a fény az okulár íriszén (mellyel a vizsgálni kívánt terület nagysága állítható be), majd egy vörös szűrőn (RG645, Schott) jut át, ami a fotoelektron-sokszorozót védi a maradék szórt kék fénytől. Az emittált fotonok a fotoelektron-sokszorozóban a fotoelektromos effektus hatására elektronáramot keltenek, a gyenge jel az elektronokat gyorsító elektromos tér miatt felerősödik. A PAM-Control egység feldolgozza, majd a számítógép felé továbbítja a beérkező jeleket. A kék fotodióda egyszerre szolgál a mérőfény, az aktinikus fény (AL) és a telítő fényimpulzusok (SP) forrásaként, melyhez az impulzusok hosszát és frekvenciáját szabályozza (8. ábra).



8. ábra A Microscopy-PAM rendszer felépítése (Microscopy-Pam kézikönyv alapján)

#### 4.7. FLUORESZCENCIA INDUKCIÓ ÉS KIOLTÁS ANALÍZIS

A PSII-ben abszorbeált fotonok energiája háromféle módon hasznosulhat: 1. töltésszétválasztás során (fotokémiai munka), 2. hő formájában disszipálódhat, 3. vörös fluoreszcencia formájában reemittálódhat. E három folyamat egymással kompetícióban van, bármelyik hatékonyságának növekedése a többi csökkenését vonja maga után. A klorofill *a* fluoreszcencia tehát információt nyújt a fotokémiai hatékonyságról és a hődisszipációról, ezért a mérésén alapuló módszereket előszeretettel alkalmazzák a növényi stresszfiziológia számos területén.

Az alkalmazott fényintenzitásokat a mikroszkóp alatt egy piciny fénymérővel, a Micro Quantum Sensor-ral (MC-MQS, Walz GmbH, Németország) mértük le.

A mérések előtt az epidermisz nyúzatokat 15 percig sötétadaptáltuk, a fluoreszcencia minimumának és maximumának ( $F_o$  és  $F_m$ ) pontos meghatározásához. Az  $F_m$  mérésére 0,8 s hosszúságú SP-t alkalmaztunk. A sötétadaptált PSII maximális kvantumhatásfokát ( $F_v/F_m$ ) Kitajima és Butler [158] leírása alapján határoztuk meg, ahol  $F_v = F_m - F_o$ .

A gyors fényválasz görbéket (RLC) a Wincontrol program 8, egyenként 30 másodperces fényintenzitás lépcsőt alkalmazó protokolljával mértük ki. Az egyes lépcsők egyre növekvő AL-t jelentenek 32-től 435  $\mu\text{mol}$  foton  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fényintenzitásig. Az egyes AL-k végén egy SP alkalmazásával határoztuk meg a fényadaptált minta maximális fluoreszcencia értékét ( $F_m'$ ). Bár a rövid AL szakaszok miatt a zárósejtek fotoszintetikus aktivitása egyik fényintenzitás esetén sem tud egyensúlyi állapotba jutni, a módszer előnye, hogy az elektrontranszport fénytelítéséről megfelelő információt nyújt és jóval több adatot szolgáltat, mint ami az egyszerű indukciós görbéből kiderülhet. A fotokémiai kioltási együtthatót ( $qP$ ), mely a nyitott PSII reakciócentrumok (RC) részarányát becsüli nem-kapcsolt RC-k esetén, a Schreiber [159] által leírt összefüggés alapján határoztuk meg. Eszerint  $qP = (F_m' - F')/(F_m' - F_o')$ , ahol  $F'$  az megvilágított minta fluoreszcencia hozamát mutatja közvetlenül SP előtt, az  $F_o'$  pedig a megvilágított minta fluoreszcencia minimuma. Mivel a Microscopy-PAM fluoriméter működési elve miatt távoli-vörös fény segítségével nem tudjuk  $F_o'$  értékét pontosan meghatározni, az Oxborough és Baker [160] által leírt közelítést alkalmaztuk, miszerint  $F_o' = 1/(1/F_o - 1/F_m + 1/F_m')$ . A PSII RC-k közti kapcsoltságot feltételezve a fotokémiai kioltási együtthatót  $qL$  paraméterrel becsültük az alábbi összefüggés alapján:  $qL = qP \cdot (F_o'/F')$  [161].

A megvilágított, működő PSII fotokémiai kvantumhatásfokát, röviden effektív kvantumhatásfokát ( $\Phi_{PSII}$ ) a következő, Genty [162] által leírt összefüggéssel számoltuk:  $\Phi_{PSII} = qP \cdot (F_v'/F_m')$ , ahol  $F_v' = F_m' - F_o'$ .  $F_v'/F_m'$  a fényadaptált PSII maximális fotokémiai kvantumhatásfokát becsüli. Másképpen, e paraméter annak a valószínűségét írja le, hogy az antennarendszerben abszorbeált foton (exciton) eléri a nyitott RC-t, és ott fotokémiai eseményt vált ki. Könnyen belátható, hogy a hőkibocsátással járó lecsengési folyamatok ezt csökkentik, emiatt  $F_v'/F_m'$  és a nem-fotokémiai kioltás egymással fordítottan arányos paraméterek. Azt, hogy  $F_v'/F_m'$  maximális fotokémiai kvantumhatásfoknak egy adott pillanatban mekkora része realizálódik ( $\Phi_{PSII}$ ), a nyitott RC-k részaránya mutatja meg ( $qP$ ).

A PSII rendszeren keresztüli lineáris elektrontranszport sebességét (ETR) a következő egyenlet alapján számoltuk ki:  $ETR = \Phi_{PSII} \cdot PPF D \cdot A \cdot f_{PSII}$ , ahol  $PPFD$  a fotoszintetikusan aktív (400-700 nm) fotonáram sűrűség [ $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ],  $A$  a beeső fényintenzitás maximális abszorpciója, a  $f_{PSII}$  pedig a PSII-re jutó fény mennyiség részaránya.  $A$  és  $f_{PSII}$  értékét konstansnak, rendre 0,84 és 0,5 értékűnek tekintettük.

A nem-fotokémiai kioltást a Stern-Volmer típusú nem-fotokémiai kioltással (NPQ) becsültük melyben az  $F_m$  csökkenésének mértékét a kioltás utáni  $F_m'$  szintre normáltuk:  $NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$  [163].

#### **4.8. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ÉS A NO KVALITATÍV VIZSGÁLATA FLUORESZCENS JELÖLŐK SEGÍTSÉGÉVEL KONFOKÁLIS LÉZER PÁSZTÁZÓ MIKROSKÓP HASZNÁLATÁVAL**

A levelek abaxiális epidermiszében jutott fluoreszcens jelölőket konfokális lézer pásztázó mikroszkóp (Olympus FV1000 LSM, Olympus Life Science Europa GmbH, Hamburg, Németország) segítségével vizsgáltuk.

A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detektálásához Amplex Red-t (AR, 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazin) (Molecular Probes Invitrogen, Carlsbad, CA) használtunk. Először 10 mM-s törzsoldatot készítettünk, ezt szobahőmérsékleten, sötétben tároltuk. A kísérletek előtt 1 mM koncentrációjú AR oldatot készítettünk 10 mM foszfát pufferben (pH 7,4), amit felhasználásáig szintén sötétben tartottunk. Peroxidázok jelenlétében az AR reakcióba lép a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel ezzel az erősen fluoreszkáló Resorufint létrehozva [164]. A Resorufin 543 nm-s HeNe lézer segítségével gerjeszthető, így a fluoreszcenciája 585 és 610 nm között detektálható.

A kontroll és a kitozán-kezelt növények levelein egy hegyes tű segítségével egy apró lyukat ejtettünk, ügyelve arra, hogy csak a fonák epidermisz sérüljön. A sérülésen keresztül egy fecskendő segítségével a levelek belsejébe injektáltuk az 1 mM-s AR oldatot. Az 5 perces sötét inkubáció elteltével az injektálástól távolabbi részeket kimetszettük, majd azt két fedőlemez közé szárazon (mivel a fürdőoldat a keletkezett Resorufin gyors kидiffundálását segítette), nyúzás nélkül rögzítettük.

A zárósejtekben megjelenő NO-t 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluoro-fluoreszcein diacetáttal (DAF-FM DA, Sigma-Aldrich, Hungary) jelöltük. A DAF-FM DA a sejtekbe bejutva az észterázok aktivitásának köszönhetően elveszíti a két acetyl

csoportját, így képes a dinitrogén-trioxid ( $N_2O_3$ ) kötésére, létrehozva a fluoreszcens N-nitrozilált diamino-fluorescein formát. Ennek fluoreszcenciája 488 nm-s HeNe lézerrel történő gerjesztés esetén 500 és 510 nm között detektálható [165]. A kísérletek során a kontroll és kitozán-kezelt levelekről epidermisz nyúzatokat készítettünk, melyekhez sötétben 10  $\mu$ M fluoreszcens jelölőt adtunk. 15 perc elteltével a mintákat inkubációs oldattal átmostuk, majd 5 perccel később a nyúzatokat két fedőlemez közé rögzítettük, és a zárósejtekben a NO felhalmozódását megvizsgáltuk.

A zárósejtek sejtmagjait 1 mg/ml Hoechst 33258 nukleinsav festékkel azonosítottuk, aminek a bejuttatását 1% Silwet L77 detergens párhuzamos alkalmazásával segítettük elő. A kloroplasztiszokat az emittált klorofill *a* fluoreszcenciájuk alapján azonosítottuk.

#### **4.9. STATISZTIKAI ANALÍZIS**

A statisztikai elemzések során az egyes napok, vagy kezelések, festések átlagait hasonlítottuk össze Student-féle t-próba segítségével, Origin Lab 8.6 program (OriginLab Corporation, USA) használatával.



## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### 5.1. A KITOZÁN A SZTÓMANYITÓDÁST HAJNALBAN GÁTOLJA, NAPKÖZBEN PEDIG TOVÁBBI NYITÓDÁS- GÁTLÁST ÉS ENYHE ZÁRÓDÁST OKOZ

A növényi sejtek, így a zárósejtek is nagyszámú sejtfelszíni receptorral rendelkeznek plazmamembránjukban, melyek a legkülönbébb MAMP vegyület felismerésére képesek [3]. A kitozán érzékelésére eddig két lehetséges receptort találtak, az egyik a kitin elicitor-kötő fehérje (CEBiP) [12] a másik pedig a rizs (*Oryza sativa*) kitin elicitor receptor kináza (*OsCERK*), ami a rizsben nélkülözhetetlennek tűnik a kitin fragmentumok érzékelésében. Amíg a CEBiP esetében a komplex képes megkötni a kitin fragmentumokat és elindítani a jelátvitelt, addig az *OsCERK* egy olyan receptor kináz család tagja, amely a kitin fragmentumok érzékelését követően kináz fehérjék jelenlétét igényli a jelátviteli utak elindításához [11].

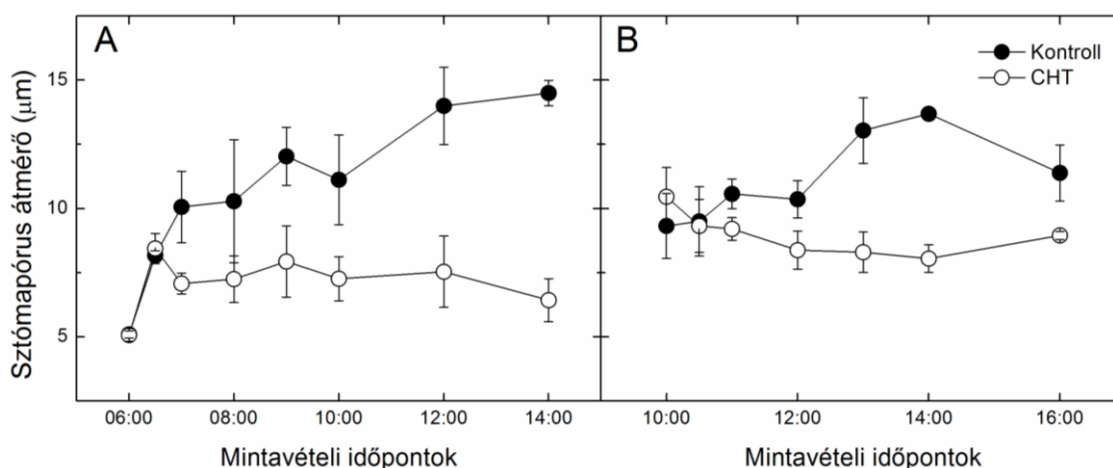
A sztómányitódás és záródás igen szerteágazó jelátviteli utak és transzporterek aktiválódását igényli. Mivel a kitozán hatását egyaránt kifejtheti a nyitódáshoz és a záródáshoz szükséges folyamatokra, így a kezeléseket két fő csoportra osztottuk. Az egyikben a kezelést hajnalban, sötétben végeztük, mikor a sztómák jelentős hányada még zárt állapotban volt, a másik típusú kezelésre pedig nappal került sor, mikor a sztómák már részben vagy teljesen nyitva voltak.

A hajnali kísérletek során a levelek fonák epidermiszét kitozán-mentes (kontroll) és kitozánt tartalmazó inkubációs oldattal ecseteltük be sötétben, 5:30-kor. Amikor a növénynevelő kamrában program szerint reggel 6:00 órakor elindult a megvilágítás, a 9. ábrán megjelölt időpontokban nyúzatokat készítettünk, azokat mikroszkóp alatt lefotóztuk, és a sztómanyílás átmérőket meghatároztuk. 6:00 órakor a sztómák még zárt állapotban voltak, az átlagos sztómaporus átmérőjük  $5.1 \pm 0.1 \mu\text{m}$  volt. A megvilágítás hatására, a kontroll növények esetében ez délután 14.00 órára a maximumára,  $14.5 \pm 0.5 \mu\text{m}$ -re emelkedett, majd a sztómák záródni kezdtek. A kitozán-kezelt növények esetében 14:00-kor az átlagos sztómaporus átmérő mindössze  $6.4 \pm 0.8 \mu\text{m}$  volt (9. ábra; A).

Annak érdekében, hogy a kitozán sztómazáró hatását is megvizsgáljuk, a növényeket közel teljes sztómányitottság mellett 10:00 órakor kitozánt tartalmazó vagy

kitozán-mentes inkubációs oldattal kezeltük. A nyúzatkészítést 10:00-kor kezdtük, majd a 9. ábrán feltüntetett időpontokban folytattuk. A kezelés időpontjában az átlagos légrés átmérő  $9.3 \pm 0.9 \mu\text{m}$  volt, ami a kontroll növények esetében 14:00-ra  $13.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$ -re emelkedett. A kitozán-kezelt növények esetében a kezelés végére a kiindulási állapothoz képest enyhe záródást tudunk megfigyelni ( $8.1 \pm 0.5 \mu\text{m}$ ), a kontrollra jellemző további nyitódás mindvégig elmaradt (9. ábra; B). A kitozán-kezelt növényeket a kezelést követő napon is megvizsgáltuk, ám ekkor már nem tapasztaltunk eltérést a kontroll növényekhez képest.

A következő kísérletsorozatban arra voltunk kíváncsiak, hogy vajon a parenchima réteg mezofillum sejtjeinek szerepük van-e a kitozán-kezelés hatására bekövetkező sztómanyitódás elmaradásában. Ennek kivizsgálására 5:30-kor és 10:00-kor epidermisz nyúzatokat készítettünk, melyeket kitozánt tartalmazó, vagy kitozán-mentes inkubációs oldatba helyeztünk. A nyúzatokat felhasználásukig  $150 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fényintenzitáson tartottuk. A felvételek készítésének időpontjai megegyeztek az előző kísérletben leírtakkal. Azt tapasztaltuk, hogy a korábbi kísérlethez nagyon hasonló eredmények születtek, nevezetesen a kitozán hatására a hajnali kezelés esetén zárva maradtak a sztómák, míg a délelőtti kezelés esetén enyhe záródás volt csak megfigyelhető, így a kitozán-kezelt levelek mezofillum sejtjeinek sztómamozgásra gyakorolt hatását kizártuk.



9. ábra A sztómaporus átmérők változása kontroll és  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  kitozán-kezelt (CHT) növények esetében a nap folyamán. A kezeléseket 5:30-kor (A) vagy 10:00-kor (B) történtek. A feltüntetett értékek három biológiai ismétlés egyenként 90 mintájának átlagából számított átlagát mutatják a standard deviáció ( $\pm$  SD) megjelenítésével.

A kitozán hatására, hajnali kezelés esetén sztómanyitódás gátlást, míg nappali kezelés esetén is csak enyhe sztómazáródást figyeltünk meg. Ez azt bizonyítja, hogy a

*Vicia faba* zárósejtje képes a kitozán érzékelésére, rendelkezik megfelelő receptorral, és képes a megfelelő jelátviteli utak bekapcsolására. A sztómamozgások hátterében a plazmamembrán (PM) és a tonoplaszt membránpotenciáljának megváltozására aktiválódó vagy inaktiválódó transzporterek állnak. A sztómanyitódás (PM hiperpolarizáció) és záródás (PM depolarizáció) során egyaránt a  $K^+$  ioncsatornák töltik be a legfontosabb szerepet. A fényaktivált nyitódás során közvetetten a PM  $H^+$ -ATPáz működésének hatására aktiválódnak a befelé egyenirányító  $K^+$ -csatornák. A záródás során az R- és S-típusú (gyorsan és lassan aktiválódó) anion csatornák egy hosszú, elnyújtott PM depolarizációt okozva aktiválják a kifelé egyenirányító  $K^+_{out}$ -csatornákat. Koers és munkatársai [166] kimutatták, hogy árpa esetében a kitozán az S-típusú anion csatornák hosszú, konstans aktiválódását okozva sztómazáródást vált ki.

A kitozán a kísérleteink során *Vicia faba* esetén viszont nem okozott erős sztómazáródást, de meggátolta a sztómanyitódást. A napközbeni erőteljes sztómazáródás elmaradásának egyik oka feltehetően a nagy mennyiségben termelődő jelátvivő molekula, a NO egyik, Sokolovski és munkatársai [115] által kimutatott hatásával magyarázható. Eszerint a NO a zárósejtek  $K^+_{out}$  ionáramát biztosító GORK ioncsatornát S-nitrozilálja, ezáltal inaktiválva azt. Működőképes GORK ioncsatornák hiányában pedig a zárósejtek képtelenek a sztómazáródás kiváltására.

## 5.2. A KITOZÁN SZEREPE A ZÁRÓSEJTEK JELÁTVITELÉNEK ALAKÍTÁSÁBAN

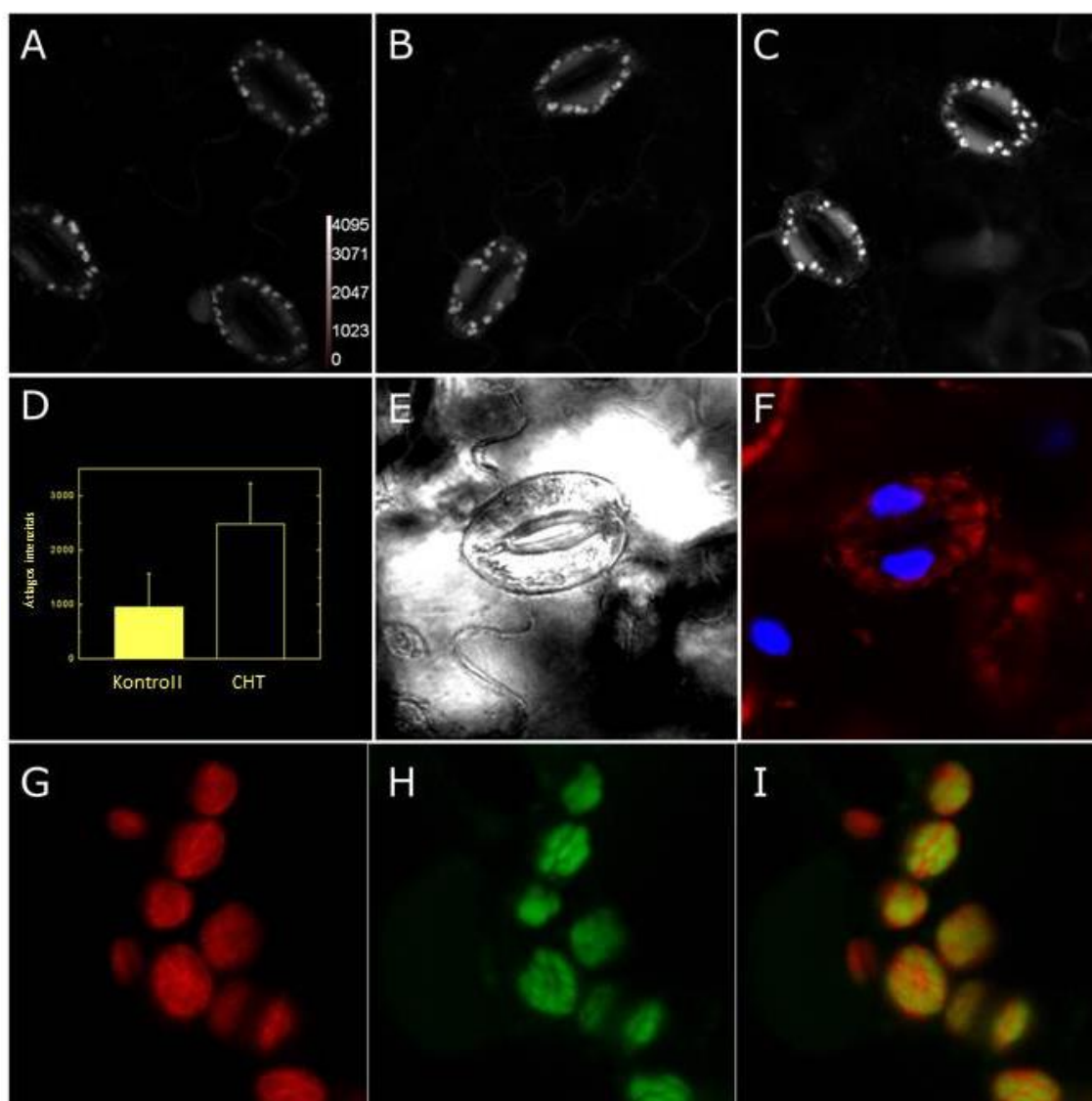
A zárósejtek MAMP-ra és ABS-ra adott válaszreakciója sok hasonlóságot mutat, mindkét esetben az S-típusú anionáramok aktiválódnak és gyors sztómazáródás történik [167, 168]. Receptoraikat vizsgálva azt találhatjuk, hogy míg az ABS esetében intracelluláris és extracelluláris receptorok felelősek az érzékelésért [169], addig MAMP esetében az érzékelés a sejt felszínén megy végbe [7]. Az ABS és MAMP érzékelését követő jelátviteli utak több közös komponenset is tartalmaznak. *Arabidopsis*-ban, a zárósejt specifikus OST1 protein kináz aktiválódása nélkülözhetetlen a sztómazáródás kiváltásához, mind az ABS, mind pedig például az *flg22* esetében [24, 170]. Az OST1 kinázzról nemrégén mutatták ki, hogy képes egy S-típusú anion csatorna, a SLAC1 aktiválására [59, 171], utalva arra, hogy az OST1 állhat a MAMP-aktivált anionáram hátterében is. Mindennek ismeretében érdekes, hogy a kísérleteinkhez használt *Vicia faba* esetében a kitozán nem okozott erős sztómazáródást.

Mind a MAMP, mind pedig az ABS jelátvitelében megtalálhatóak a ROS és a NO jelátvivő molekulák [172-176]. Srivastava és munkatársai [106] kimutatták, hogy borsó növények esetében már  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  kitozán is jelentős ROS és NO növekedést indukált. Megfigyelték, hogy már 5 perccel a kitozán-kezelést követően elsőként ROS (főleg  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) jelenik meg, míg a NO körülbelül csak 1 óra elteltével mutatható ki. Igazolták azt is, hogy a 2-(4-karboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxid-3-oxid (cPTIO), mint NO kioltó vegyület, a nátrium-volframát, mint a NR gátlószere, az L-NAME (N-nitro-L-Arg-metil-észter), mint NOS-inhibitor, a kataláz vagy a DPI (difenilén-jodónium), mint a NADPH-oxidáz gátlószereinek alkalmazása révén elmaradt a kitozán-indukált sztómazáródás. Mindez a  $\text{H}_2\text{O}_2$  és a NO fontos szerepét bizonyította a kitozán-indukált sztómazáródásban. A továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy vajon *Vicia faba* zárósejtekben is kimutatható-e a kitozán-kezelést követő  $\text{H}_2\text{O}_2$  és NO felhalmozódás.

#### 5.2.1 A KITOZÁN-KEZELÉS HATÁSÁRA KELETKEZŐ $\text{H}_2\text{O}_2$ DETEKTÁLÁSA

A kitozán-által kiváltott  $\text{H}_2\text{O}_2$  szubcelluláris szinten történő vizsgálatához egy specifikus  $\text{H}_2\text{O}_2$  jelölőt, az AR-t alkalmaztuk. Azt tapasztaltuk, hogy a kitozán-kezelt mintákban a  $\text{H}_2\text{O}_2$  elsősorban a kloroplasztiszokban és a sejtmagvakban halmozódik fel (10. ábra, C). A 10. D ábra a kontroll és kitozán-kezelt minták átlagos, relatív AR intenzitását mutatja be, amely alapján kijelenthetjük, hogy a kitozán hatására, már 1 óra után  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelődik. A kloroplasztiszokon belüli  $\text{H}_2\text{O}_2$  eloszlását megvizsgálva (10. ábra, G-I), kiderült, hogy a  $\text{H}_2\text{O}_2$  elsősorban a sztrómában jelölődik.

Fontosnak tartottuk annak vizsgálatát is, hogy a kitozán oldódását segítő nátrium-acetát okoz-e  $\text{H}_2\text{O}_2$  termelődést. Mivel 1 mM nátrium-acetátot tartalmazó inkubációs oldat és a nátrium-acetát-mentes inkubációs oldat hatása között nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést (10. ábra A és B), a későbbi vizsgálatok során kontrollként csak az 1 mM nátrium-acetátot tartalmazó inkubációs oldatot használtuk.

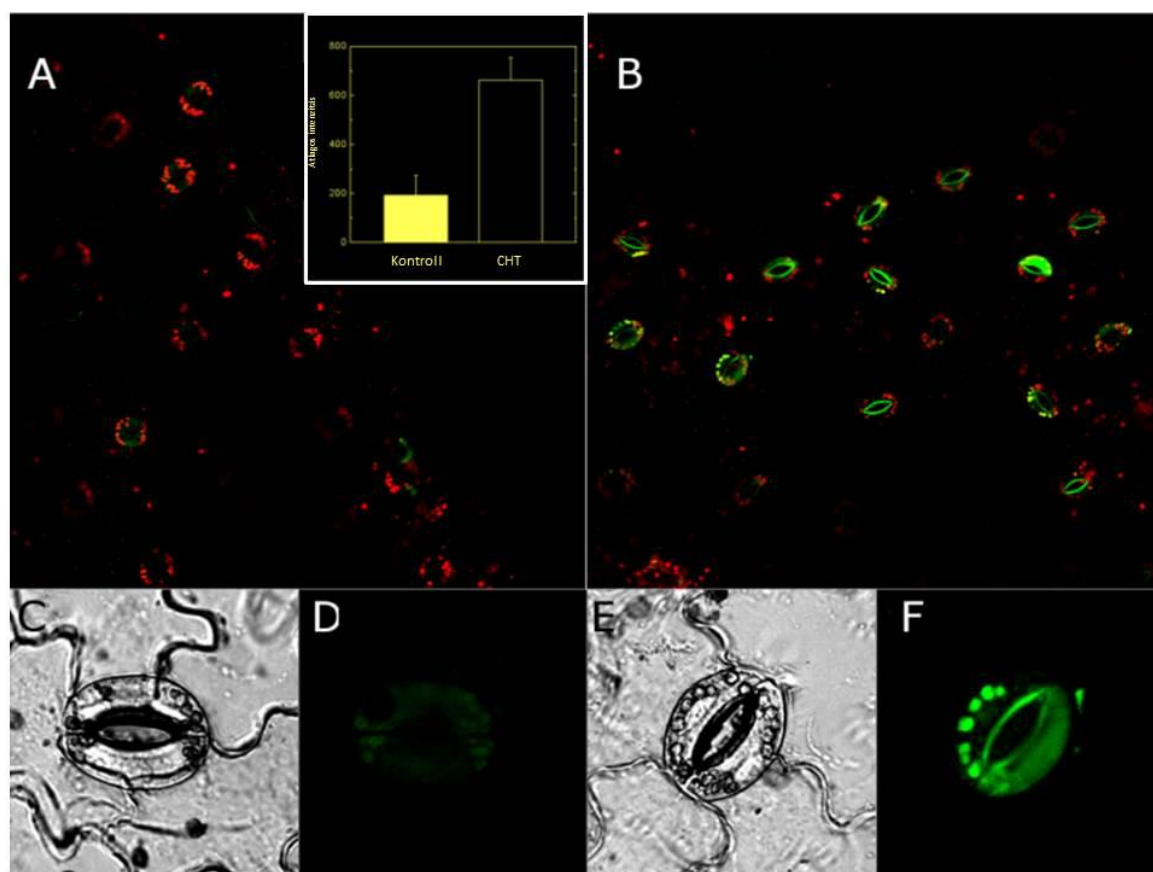


10. ábra A specifikus  $H_2O_2$  jelölő AR eloszlása a kontroll (A), acetátos kontroll (B) és kitozán-kezelt (C) levelek esetében. Az átlagos AR intenzitások (D) jól mutatják, hogy a kitozán hatására megemelkedik a  $H_2O_2$  szintje az acetátos kontrollhoz képest. A  $H_2O_2$  elsősorban a kloroplasztiszokban, ezen belül is feltehetően a sztrómában (G-I), és a sejtmagokban halmozódott fel. A sejtmagok azonosítására Hoechst 33258 festést alkalmaztunk (E-F). A G-I jelű képeken a vörös szín a klorofill autofluoreszcenciáját, míg a zöld szín az AR fluoreszcenciáját mutatja. Az F jelű képen a kék szín a Hoechst 33258 festék által megfestett sejtmagokat mutatja.

### 5.2.2. A KITOZÁN-KEZELÉS HATÁSÁRA KELETKEZŐ NO DETEKTÁLÁSA

A  $H_2O_2$  jelátvivőt is magába foglaló, sztómaródást kiváltó jelátviteli útnak egy másik komponense a NO. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy a kitozán-kezelés hatására vajon keletkezik-e NO, a kontroll és a kitozán előkezelt levelekből nyúzatokat

készítettünk, melyeket 10  $\mu$ M DAF-FM specifikus NO jelölővel festettünk meg. A 11. ábrán jól látható, hogy a kontroll nyúzatok esetében a vörös klorofill autofluoreszcencián kívül, csak nagyon alacsony, zöld színnel jelölt DAF fluoreszcencia figyelhető meg (A), míg a kitozán-kezelt mintákon a magas DAF fluoreszcencia volt tapasztalható (B). Az eredmények alapján tehát kijelenthetjük, hogy a kitozán-kezelt mintákban, a kontroll mintákhoz viszonyítva 1 óra elteltével jelentős NO felhalmozódás történik. Jól látható továbbá az is, hogy a NO sejten belüli eloszlása hogyan változik meg a kitozán-kezelés hatására: míg a kontroll zárósejtek esetében az alacsony DAF jel elsősorban a kloroplasztiszokból származik, addig a kitozán-kezelt mintákban a citoplazmában, a pórus körüli sejtfaalakban és a kloroplasztiszokban is megnövekedett DAF fluoreszcenciát tudtunk detektálni.



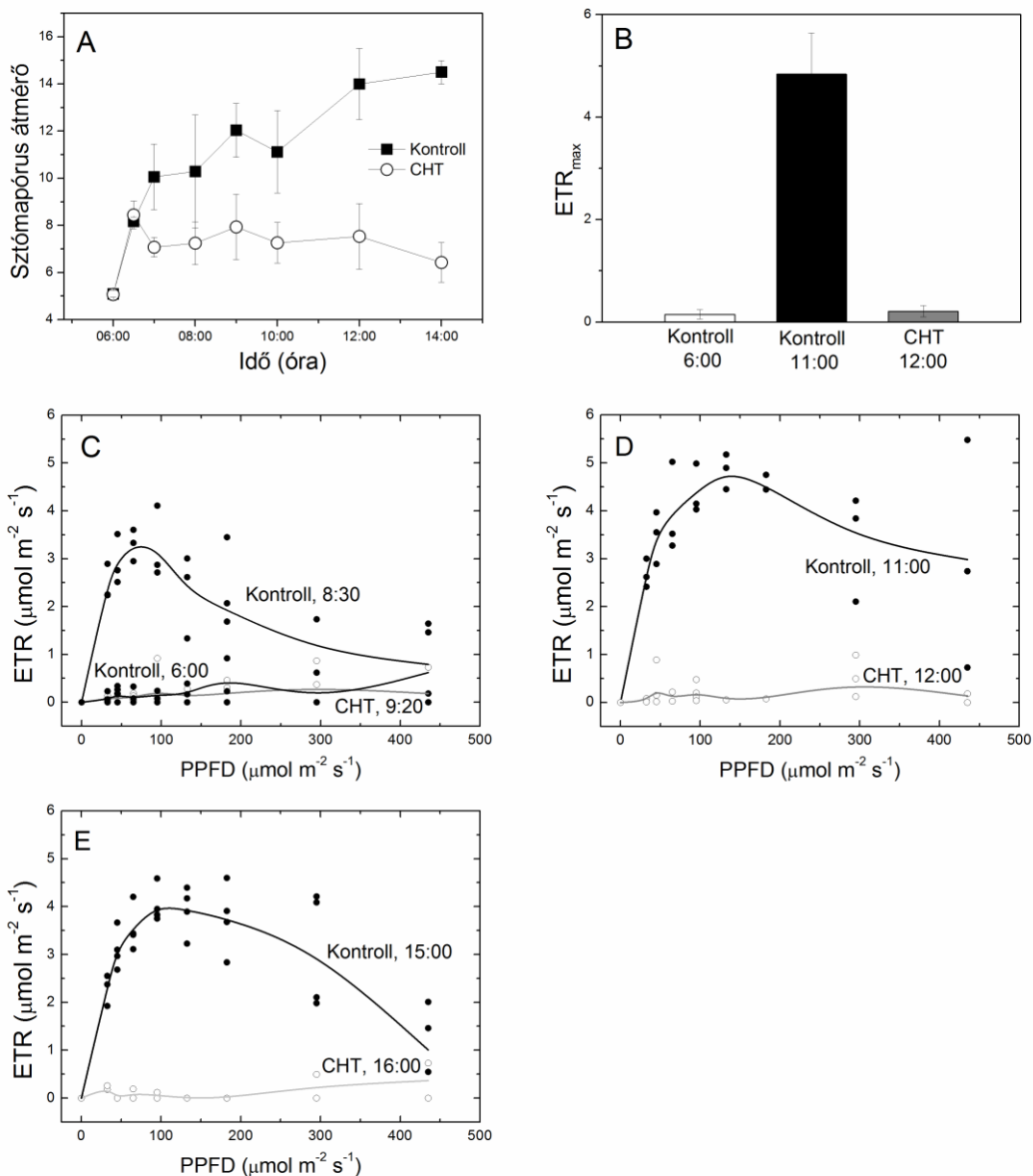
11. ábra Az A-B ábrákon a 10  $\mu$ M DAF-FM-mel jelölt kontroll (A) és kitozán előkezelt (B) nyúzatok mikroszkópos felvételeit láthatjuk. A kis nagyítású felvételeken jól látható a különbség a kontroll és a kitozán-kezelt minták sztómái között (zöld – DAF fluoreszcencia, piros – klorofill autofluoreszcencia). A C-F ábrákon ugyanez figyelhető meg egy-egy sztóma esetén, ahol jól látható, hogy a DAF fluoreszcenciája elsősorban a kloroplasztiszokból, a pórus körüli sejtfaalakból és a citoplazmából származik.

---

### 5.3. A KITOZÁN SZEREPE A ZÁRÓSEJTEK FOTOSZINTÉZISÉBEN

#### 5.3.1 A HAJNALI KITOZÁN-KEZELÉS GÁTOLJA ETR NÖVEKEDÉSÉT

A kitozán hatására bekövetkező nyitódásgátlás hátterében a zárósejtek önálló fotoszintetikus aktivitásából származó ATP illetve NADPH szintjének csökkenése is állhat. Annak felderítésére, hogy a kitozán befolyásolja-e a zárósejtek fotoszintézisét, a kontroll és kitozán-kezelt zárósejtek RLC görbéit vetettük össze. Ehhez az intakt leveleket, 30 perccel a hajnali megvilágítás előtt a kezelési oldatokkal bepermeteztük, majd a jelzett időpontokban friss epidermisz nyúzatokat készítettünk. A nyúzatokat a mérések előtt az inkubációs oldatban 15 percig sötét adaptáltuk. Megállapítottuk, hogy a kontroll levelekről készített nyúzatok zárósejtjei reggel 6.00 órakor bármely AL fényintenzitás esetében alacsony ETR értéket mutattak. Az ETR maximális értékeit ( $ETR_{max}$ ) tekintve mindez délelőttre jelentősen emelkedett, míg délutánra enyhén csökkent (12. ábra; A-B). Ezzel ellentétben, a kitozán-kezelt zárósejtek, a nap folyamán bármely AL intenzitáson minimális ETR értékkel rendelkeztek (12. ábra; C-E).



12. ábra A sztómányílás átmérőjének és a zárósejtek fotoszintetikus aktivitásának időbeli összefüggése. Az A ábra a sztómányílások átmérőjét, a B ábra a jelzett időpontokban mért  $ETR_{max}$  értékeket mutatja. Jól látható, hogy a hajnali kontroll minták (6:00) alacsony  $ETR_{max}$  értékkel rendelkeztek, mely a kontroll minták esetében délelőtt (11:00) erőteljesen megemelkedett, míg a kitozán-kezelt (CHT) zárósejtek (12:00) a hajnali mintához hasonló alacsony értéket mutattak. A C-E ábrákon nyomon követhetjük az RLC görbék napközbeni, kontroll és kitozán-kezelést követő változását. Az egyes ábrákon időpontonként 3-4 mérés (fekete körök – kontroll minták, fehér körök – kitozán-kezelt minták) átlagait ábrázoltuk (fekete vonal – kontroll ETR értékek átlaga, szürkevonál – kitozán-kezelt minták ETR-értékeinek átlagai).



## 5.3.2. A FOTOSZINTETIKUS PARAMÉTEREK ALAKULÁSA HAJNALI KITOZÁN-KEZELÉS UTÁN

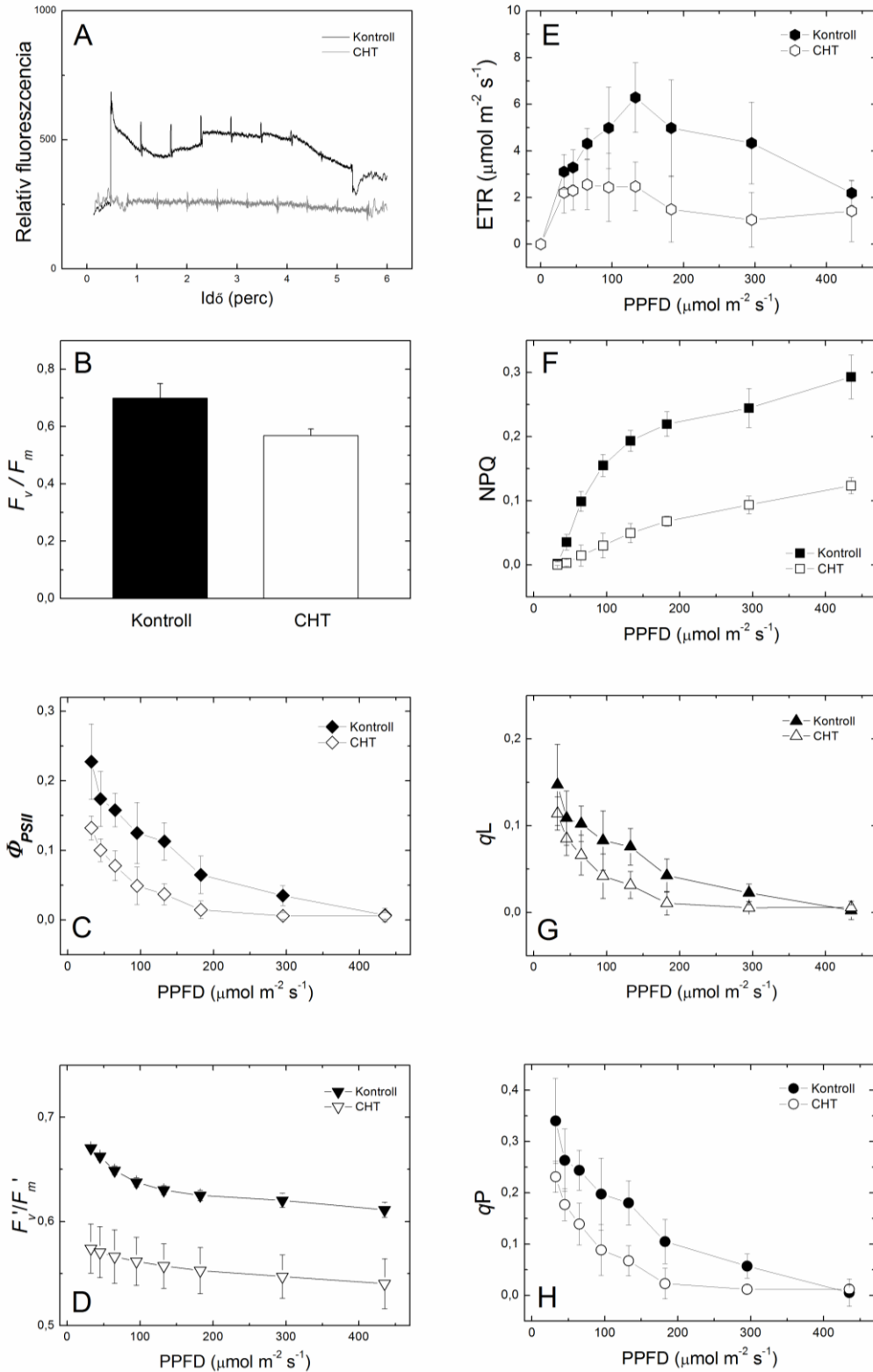
A kitozán-kezelés hatására bekövetkező elektrontranszportlánc gátlás hátterét kutatva megvizsgáltuk az RLC protokoll során mért egyéb fluoreszcencia paraméterek alakulását is. A 13. ábra a hajnali kitozán-kezelés hatását mutatja az  $F_v/F_m$ , a  $\Phi_{PSII}$ , az NPQ, az  $F_v'/F_m'$ , a  $qL$  és a  $qP$  paraméterek esetében.

A 15 perces sötétadaptációt követően sötétben mért maximális kvantumhatásfok zárósejtekre jellemző 0,7 körüli értéke a kitozán-kezelés hatására 0,57-re csökkent (13. ábra, B). Ennek hátterében elsősorban az  $F_m$  csökkenése áll (13. ábra, A).

Az RLC görbék felvétele során megfigyeltük, hogy a kitozán-kezelt minták esetében a relatív fluoreszcencia hozam a kontrollhoz képest magasabb volt, míg a  $\Phi_{PSII}$  értékek a kontrollhoz képest szignifikánsan alacsonyabbak voltak minden egyes AL intenzitásnál. Az ETR paraméter értékei ennek megfelelően szintén alacsonyak voltak minden egyes AL intenzitásnál (13. ábra, E).

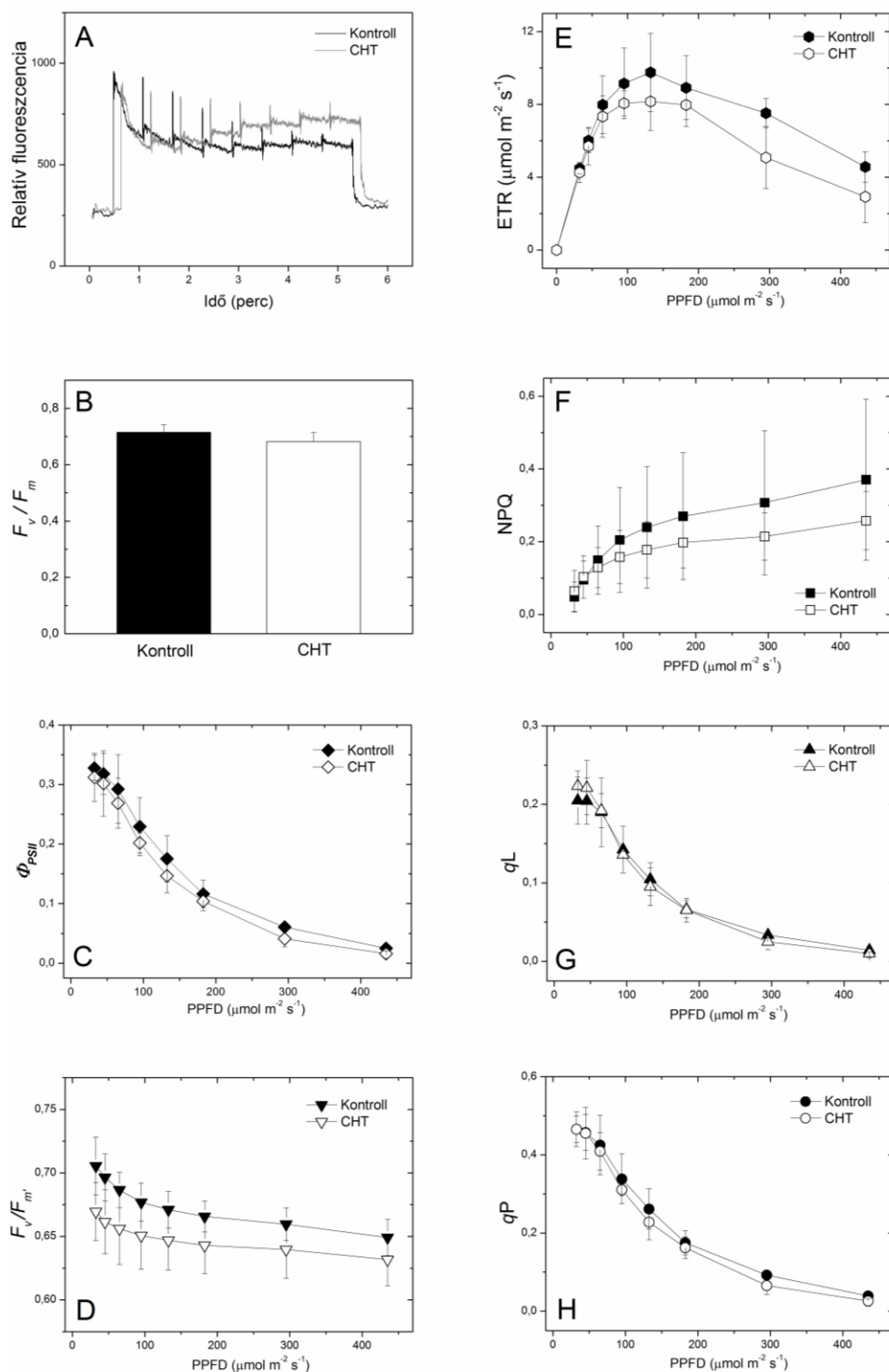
A 13. ábrán látható, hogy  $\Phi_{PSII}$  csökkenéséhez a  $qP$  és az  $F_v'/F_m'$  csökkenése is, bár más és más módon, de egyaránt hozzájárul (13. ábra, C, D, H)). Az  $F_v'/F_m'$  paraméter esetében a kitozán-kezelés, minden AL intenzitás mellett nagyjából azonos mértékű csökkenést okozott, a  $qP$  paraméter viszont az 50-200  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  AL tartományban csökkent a legnagyobb mértékben. A kapcsolt reakciócentrumokat feltételező fotokémiai kioltás,  $qL$ , a  $qP$ -hez nagyon hasonló módon csökkent a kitozán-kezelés után (13. ábra, G).

Az NPQ szintén jelentős módon redukálódott minden AL intenzitás esetén (13. ábra, F).



13. ábra A kontroll és kitozán-kezelt (CHT) zárósejtek RLC görbéi során mért relatív fluoreszcencia hozam (A) és a fotoszintetikus paraméterek (B-H) változásai. A kezelés a fény bekapcsolása (6:00) előtt 30 perccel történt, a méréseket 11:00 és 13:00 között végeztük el. Az egyes grafikonok 4 különböző mérési nap átlagát és a hozzá tartozó standard deviáció értékeket ( $\pm$  SD) mutatják be.

5.3.3. A FOTOSZINTETIKUS PARAMÉTEREK ALAKULÁSA NAPKÖZBENI KITOZÁN-KEZELÉS UTÁN



14. ábra A kontroll és kitozán-kezelt (CHT) zárósejtek RLC görbéi során mért relatív fluoreszcencia hozam (A) és a fotoszintetikus paraméterek (B-H) változásai. A kezelés napközben (10:00) történt, a méréseket 13:00 és 15:00 között végeztük el. Az egyes grafikonok 3 különböző mérési nap átlagait és a hozzá tartozó standard deviáció értékeit ( $\pm$  SD) mutatják be.

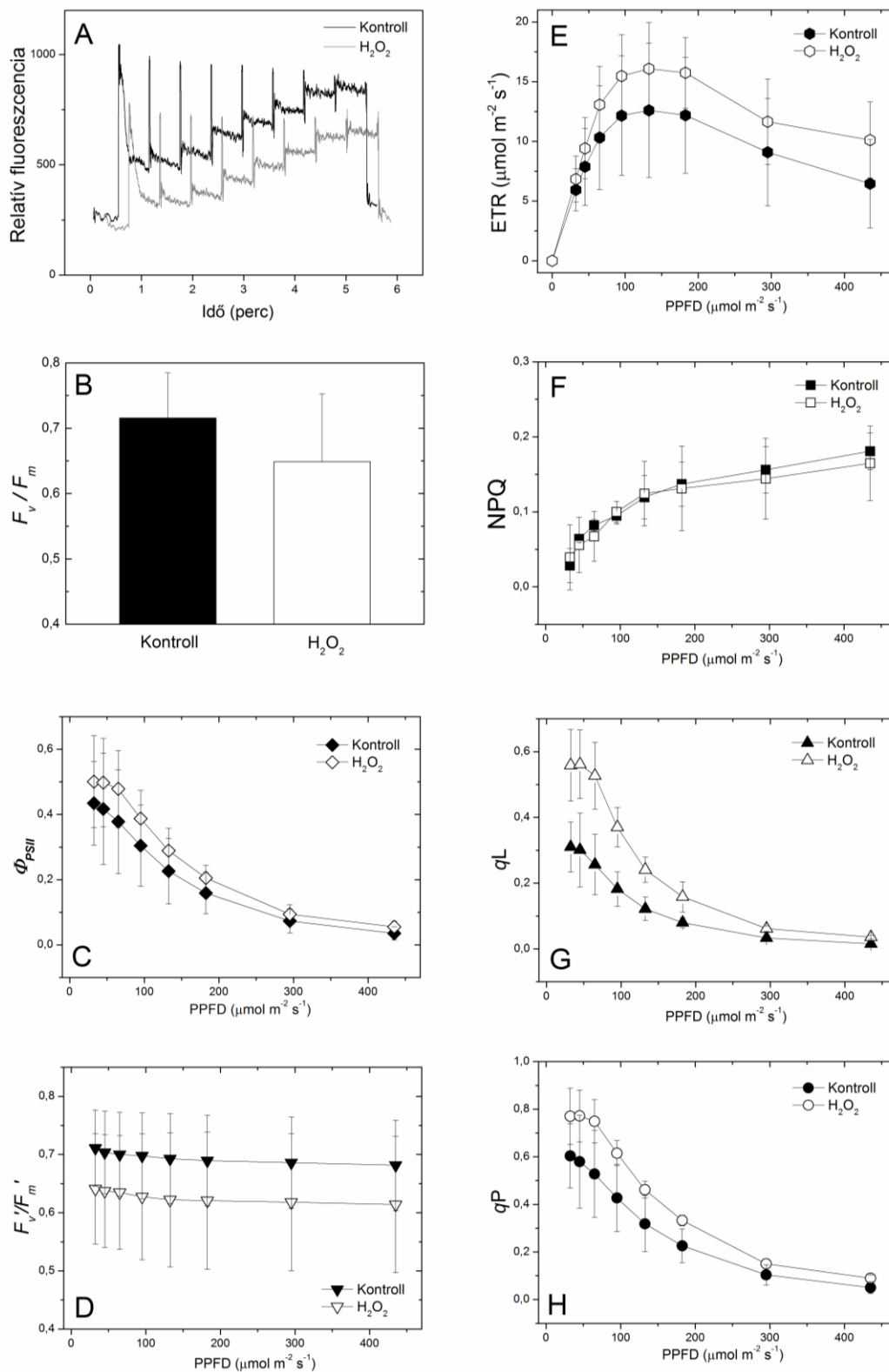
A napközben, nyitott sztómájú leveleken alkalmazott kitozán a zárósejtek fotoszintetikus aktivitásában nem okozott változást a kontroll kezeléshez képest. Sem a relatív fluoreszcencia hozam emelkedését (14. ábra, A) sem a korábban vizsgált fluoreszcencia paraméterek szignifikáns csökkenését nem tapasztaltuk (14. ábra, B-H).

Mivel a kitozán nem tud a zárósejtekbe bejutni, hatását kizárólag azok jelátviteli kaszkádján keresztül képes kifejteni. Annak kiderítésére, hogy ez vajon hogyan kapcsolódik a zárósejt fotoszintézisének gátlásához, további kísérleteket végeztünk el.

#### 5.4 A KÜLSŐ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> KEZELÉS HATÁSA A ZÁRÓSEJTEK FLUORESZCENCIA PARAMÉTEREIRE

Vajon a zárósejtek kloroplasztisaiban kitozán-kezelésre felhalmozódó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> okozhatja-e a korábban megfigyelt változásokat? Erre vonatkozóan olyan kísérleteket terveztünk, melyek során *Vicia faba* epidermisz nyúzatokat 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kezeltünk. A kísérlet elején a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mentes inkubációs fürdőoldatban lévő zárósejtek 15 percig sötét adaptáltak és meghatároztuk az  $F_v/F_m$  paraméter értékét. Ezután a 8 lépésből álló RLC protokollt futtattuk a fénygörbék felvételéhez. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatásának kiderítéséhez a tálka aljára rögzített nyúzatot 15 percig sötétadaptáltak és eközben a fürdőoldatot az oldatcserélővel a 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t tartalmazó inkubációs oldatra cseréltük. Az  $F_v/F_m$  paramétert meghatároztuk és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-kezelt sztómákon az RLC görbe protokollját újra lefuttattuk. A kísérletek az alábbi eredményeket hozták: a relatív fluoreszcencia hozam a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-kezelés hatására minden esetben csökkent (15. ábra, A), valamint az  $F_v/F_m$ , a  $\Phi_{PSII}$ , a  $qP$ , az ETR és az NPQ paraméterek nem szignifikáns mértékű csökkenésében is látható (15. ábra, B, C, E, F, H). Az  $F_v'/F_m'$  esetében kismértékű, ám nem szignifikáns mértékű növekedést tapasztaltunk (15. ábra, D). A kapcsolt reakciócentrumokat feltételező fotokémiai kioltás, a  $qL$  esetében a 200 µmol foton m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> AL-nál kisebb fényintenzitásoknál tapasztaltunk egyedül szignifikáns mértékű eltérést a kontroll mérésekhez képest (15. ábra, G). A  $qL$  paraméter, azaz a PSII hatékonysági faktora kismértékű emelkedésének hátterében a tilakoid-kapcsolt és a sztómában lévő szolubilis aszkorbát-peroxidáz enzim aktivitása állhat, mely a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> redukálásához a lineáris elektrontranszportlánc elektronjait használja fel.

Mivel a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-kezelés nem eredményezett a hajnali kitozán-kezelésre jellemző változásokat, ezért a következőkben az exogén NO fotoszintézisre gyakorolt hatását vizsgáltuk meg alaposabban.



15.ábra A kontroll és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-kezelt zárósejtek RLC görbéi során mért relatív fluoreszcencia hozam (A) és a fotoszintetikus paraméterek (B-H) változásai. A kezelések az első mérést követő sötétadaptáció során történtek. A méréseket 13:00 és 15:00 között végeztük el. Az egyes grafikonok 3 különböző mérési nap átlagait és a hozzá tartozó standard deviáció értékeit ( $\pm$  SD) mutatják be.

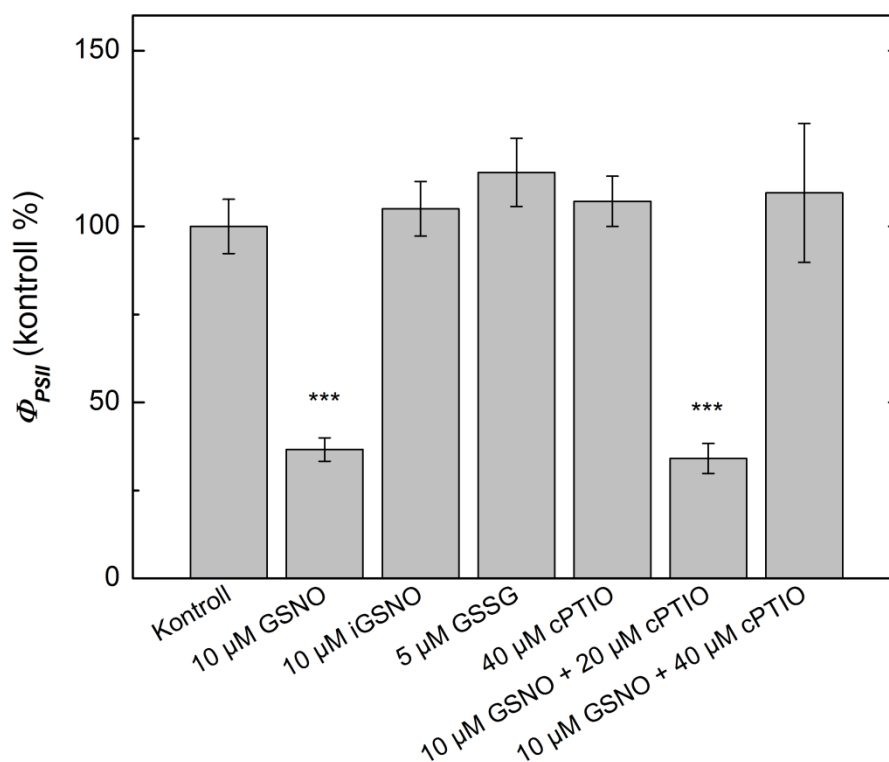
## 5.5. A NO HATÁSA A ZÁRÓSEJTEK FOTOSZINTETIKUS AKTIVITÁSÁRA

Korábbi *in vitro* és *in vivo* kutatásokra alapozva elgondolásunk szerint a NO zárósejtekben a jelátviteli funkcióján kívül a fotoszintézis reverzibilis gátlószereként is szerepelhet, nagyobb mennyiségben pedig a zárósejtek Calvin-Benson ciklusát is gátolhatja. Jelen fejezetben *Vicia faba* abaxiális epidermisz nyúzatán sejtszintű klorofill *a* fluoreszcencia mérésével *in vivo* próbáljuk igazolni feltevésünket.

### 5.5.1. AZ NO-DONOR GSNO SPECIFIKUSSÁGA, FOTOLÍZISE MELLÉKTERMÉKEINEK HATÁSAI ÉS A GSNO-BÓL FELSZABADULÓ NO MENNYISÉGE

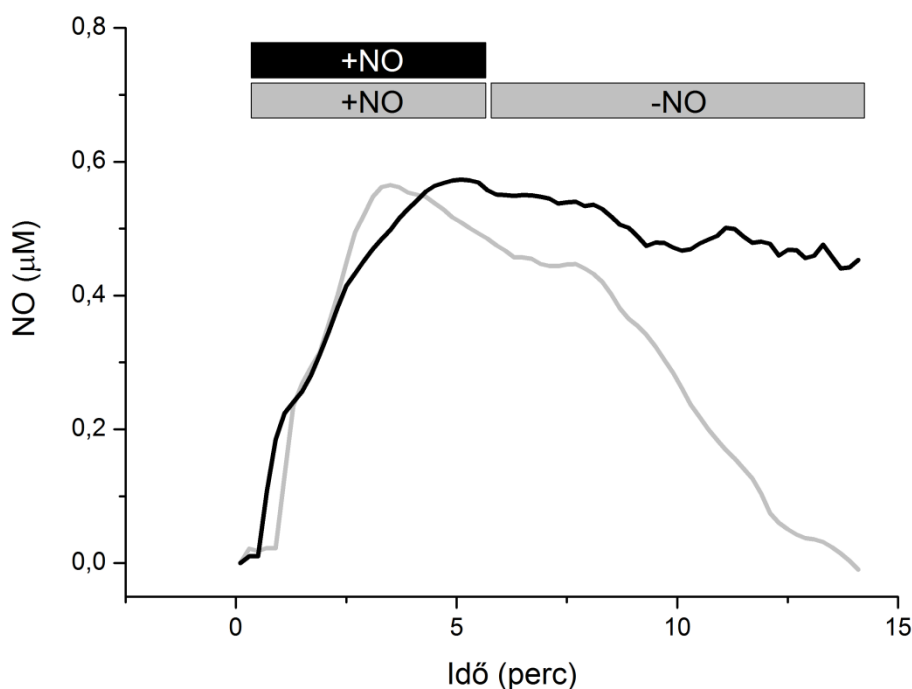
Mielőtt a NO a zárósejtek fotoszintetikus aktivitására gyakorolt hatását megvizsgáltuk, a kísérleteinkben használt NO-donor GSNO specifitasságát és lehetséges mellékhatásait tisztáztuk. *Vicia faba* növény abaxiális epidermiszének friss nyúzatát egy fémháló segítségével a mérőtálka aljára rögzítettük, hogy ugyanazon sztóma fluoreszcencia paramétereit vizsgálhassuk a GSNO hozzáadása előtt és után.

A mintákat a mérések előtt 15 percig sötét adaptáltuk, majd különböző kísérleti oldatokban, 15 percen keresztül, 500  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  intenzitású fehér fényel világítottuk meg őket. Azt tapasztaltuk, hogy 10  $\mu\text{M}$  GSNO alkalmazása mellett az egyensúlyi  $\Phi_{PSII}$  jelentősen csökken (16. ábra). Ezzel szemben, ha nyitott edényben 24 óráig, 500  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  intenzitású fehér megvilágítással inaktivált 10  $\mu\text{M}$  GSNO oldatot (iGSNO) alkalmaztunk, a  $\Phi_{PSII}$  paraméter nem csökkent. A GSNO fotolízise során a NO mellett oxidált glutation (GSSG) is keletkezik, mely megzavarhatja a kloroplasztiszok redox jelátviteli rendszerét [177]. Kísérleti rendszerünkben az 5  $\mu\text{M}$  GSSG oldat szintén nem befolyásolta  $\Phi_{PSII}$  alakulását. A NO specifikus hatás tesztelésére a legegyszerűbb mód, a NO kioltójának, a cPTIO-nak az alkalmazása. 40  $\mu\text{M}$ -nyi cPTIO képes volt a 10  $\mu\text{M}$  GSNO hatását kivédeni, viszont fontos azt is megemlíteni, hogy önmagában alkalmazva a kontrollhoz képest nem okozott változást. Érdekes, hogy 20  $\mu\text{M}$ -nyi cPTIO nem képes a 10  $\mu\text{M}$  GSNO hatását kivédeni (16. ábra). A NO vizes oldatokban oxigénnel és vízzel gyorsan reakcióba lép, miközben  $\text{NO}_2^-$  és  $\text{NO}_3^-$  keletkezhet. Eredményeink szerint azonban az említett anionok nincsenek hatással a vizsgált fotoszintetikus paraméterekre (adatok bemutatása nélkül).



16. ábra A zárósejtek egyensúlyi  $\Phi_{PSII}$  paraméterének alakulása 15 perces,  $500 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  PPFD AL fehér fényvel történő megvilágítást követően különböző összetételű fürdőoldatokban. Az egyes oszlopok minimum 5 mérés átlagát mutatják a hozzájuk tartozó standard deviáció értékekkel ( $\pm$  SD). A statisztikai elemzés Student-féle t-próbával történt (\*\*\*) $P < 0.001$ ).

A fotolabilis GSNO donorból felszabaduló NO mennyiségét amperometriás úton, NO-elektrod segítségével határoztuk meg. Az  $50 \mu\text{M}$  GSNO-t tartalmazó inkubációs elegyet egy elkülönített, átlátszó edényben  $500 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  intenzitású fehér fényvel világítottuk meg. A fotolízis során keletkező NO-t tartalmazó inkubációs elegyet ezután egy gyors oldatcserélő rendszeren keresztül juttattuk a mikroszkóp tárgyasztalán sötétben lévő Petri-csészébe. A NO elektródot a Petri- csészébe merítettük, és azt tapasztaltuk, hogy benne a NO koncentrációja az oldatcsere elindítását követő 1 perces lag fázis után 3-4 perc alatt  $450 \text{ nM}$  fölé emelkedett, és ezen érték közelében további 10 percen többé kevésbé állandónak is bizonyult (17. ábra fekete vonal). A NO kimosásához NO-mentes inkubációs oldatot használtunk. A 17. ábrán jól látható, hogy a NO kimosódása az oldatcsere indítását követően 1-2 percen belül elkezdődik, és nagyjából 10 perc alatt be is fejeződik.



17. ábra Az 50  $\mu\text{M}$  GSNO-ból felszabaduló NO mennyiségének időbeli nyomon követése a kísérleti rendszerben. A GSNO fotolízisét egy a mikroszkóptól eltakart helyen, átlátszó téglében,  $500 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  intenzitású fehér fényel indukáltuk. A keletkezett NO-t tartalmazó inkubációs oldatot egy gyors oldatcserélő rendszer segítségével jutattuk a mikroszkóp tárgyasztalán található Petri-csészébe. Az ábrán látható fekete görbe a Petri-csésze NO koncentrációját mutatja az idő függvényében, mely az oldatcsere befejezése után további 10 percen keresztül 450 nM fölött volt. A szürke görbe a Petri-csésze NO-mentes inkubációs oldattal való átmosását mutatja, mely a NO kiürülését a rendszerből felgyorsította. Az oldatcserélő rendszer a működése közben a Petri-csészében folyamatosan 2 ml térfogatú oldatot tartott, az átfolyási sebessége  $4,2 \text{ ml perc}^{-1}$  volt.

#### 5.5.2. A NO HATÁSA A ZÁRÓSEJTEK FLUORESZCENCIA PARAMÉTEREIRE. REVERZIBILITÁS.

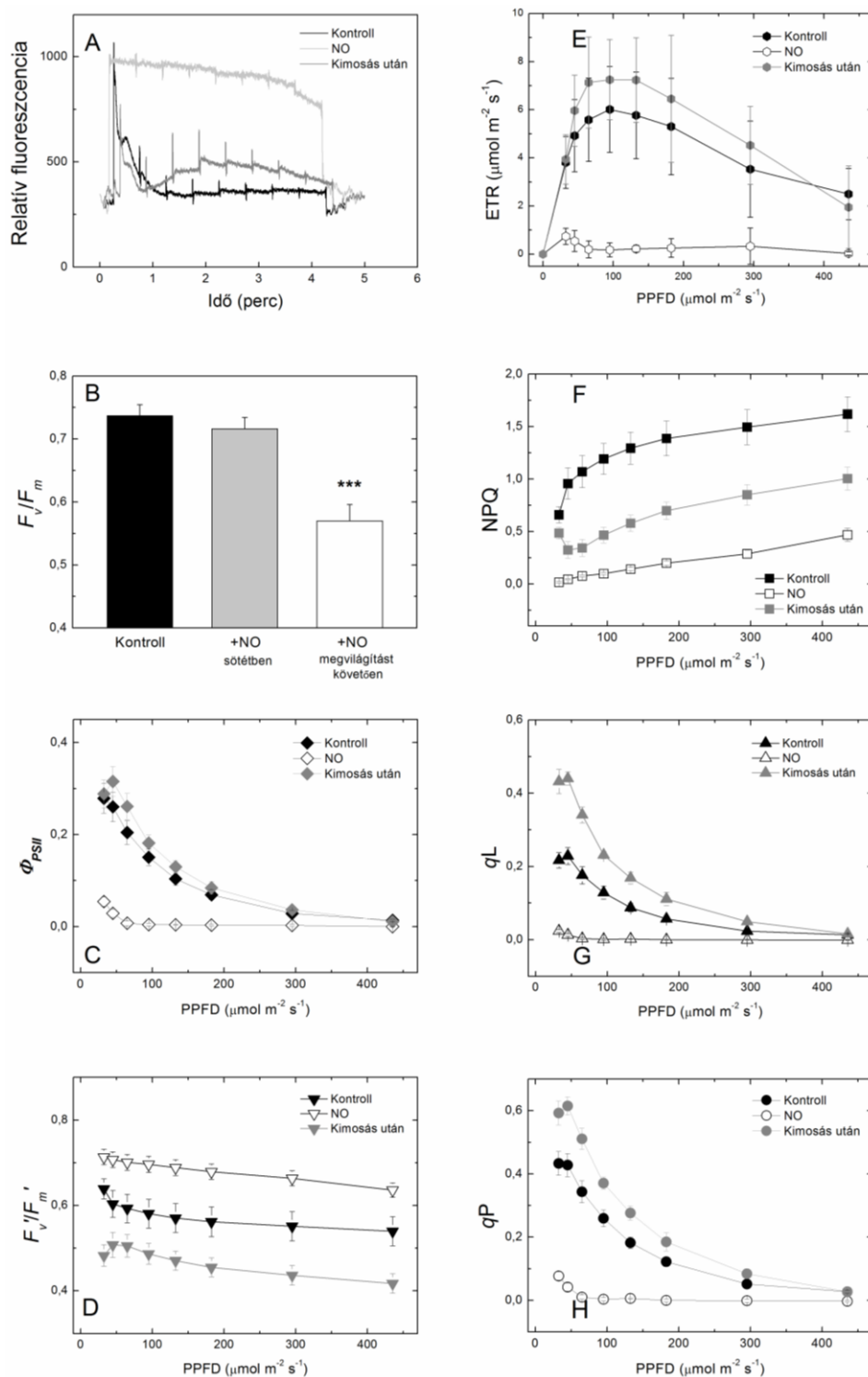
A következő kísérletsorozatban a Microscopy-PAM detektorára egy látóteret szűkítő írisz segítségével 2-3 sztóma fluoreszcens jelét engedték, és a zárósejtek RLC görbéit vizsgáltuk. A kísérlet elején a NO-mentes inkubációs fürdőoldatban lévő zárósejteket 15 percig sötét adaptáltuk és meghatároztuk az  $F_v/F_m$  paraméter értékét. Ezután a kitozán-kezelések során is alkalmazott, 8 lépésből álló RLC protokollt futtattuk a fénygörbék felvételéhez. A NO hatásának kiderítéséhez a tálka aljára rögzített nyúzatot 15 percig sötét adaptáltuk és eközben a fürdőoldatot az oldatcserélővel a 450 nM NO-t tartalmazó inkubációs oldatra cseréltük. Az  $F_v/F_m$  paramétert meghatároztuk és az NO-kezelt sztómaikon az RLC görbe protokollját újra lefuttattuk. A reverzibilitás



megállapításához egy újabb 15 perces sötétadaptáció közben a mérőedényt NO-mentes inkubációs oldattal átmostuk, majd  $F_v/F_m$  meghatározása után a harmadik RLC görbét is felvettük. Az alábbi ábrák 6 azonos módon elvégzett független mérés átlagát mutatják be (18. A-H ábra).

A 18. A ábra az RLC kísérlet közben mérhető relatív fluoreszcencia hozam alakulását mutatja az idő függvényében. Megállapítottuk, hogy a NO-kezelés jelentősen növelte a relatív fluoreszcencia hozamot minden fényintenzitásnál, mely a fluoreszcenciát kioltó folyamatok gyengülésére enged következtetni. A NO kimosása után e hatás reverzibilisnek mutatkozott. A fluoreszcencia kioltásokat elemezve az alábbi eredményekre jutottunk (18. ábra, B-H). Úgy találtuk, hogy a sötétben alkalmazott NO-kezelés nem módosítja, megvilágítás mellett viszont szignifikánsan csökkenti az  $F_v/F_m$  paraméter értékét (18. ábra, B). Az effektív kvantumhatásfok  $\Phi_{PSII}$  értékei minden fényintenzitáson jelentős csökkenést mutattak a kontrollhoz képest (18. ábra, C).  $\Phi_{PSII}$  csökkenésében a  $qP$  komponensének gyengülése áll (18. ábra, H), mely a kapcsolt reakciócentrumokat feltételező fotokémiai kioltási együttható,  $qL$  esetében ugyanúgy megfigyelhető (18. ábra, D). A  $\Phi_{PSII}$  paraméter másik komponense, a megvilágítás közben mért maximális fotokémiai kvantumhatásfok,  $F_v'/F_m'$  esetében viszont a NO kezelés inkább növekedést váltott ki (18. ábra, D). A növekedés mögött feltehetően a nem-fotokémiai kioltási folyamatok, legnagyobb részben a hődisszipáció térvessztése állhat, amit jól mutat az NPQ paraméter minden egyes AL fényintenzitásnál tapasztalható csökkenése is (18. ábra, F).

A kísérletek harmadik fázisában, a sötétadaptáció közben a NO-t tartalmazó oldatot NO-mentes, friss inkubációs oldatra cseréltük, majd ugyanezen sejteken az RLC protokollt futattuk. A mérések alapján kijelenthetjük, hogy a kimosás a relatív fluoreszcencia hozamot, a  $\Phi_{PSII}$ ,  $qP$ ,  $qL$  paramétereket teljesen, az  $F_v'/F_m'$ , NPQ paramétereket részlegesen helyreállította (18. C-H ábra, Kimosás után).



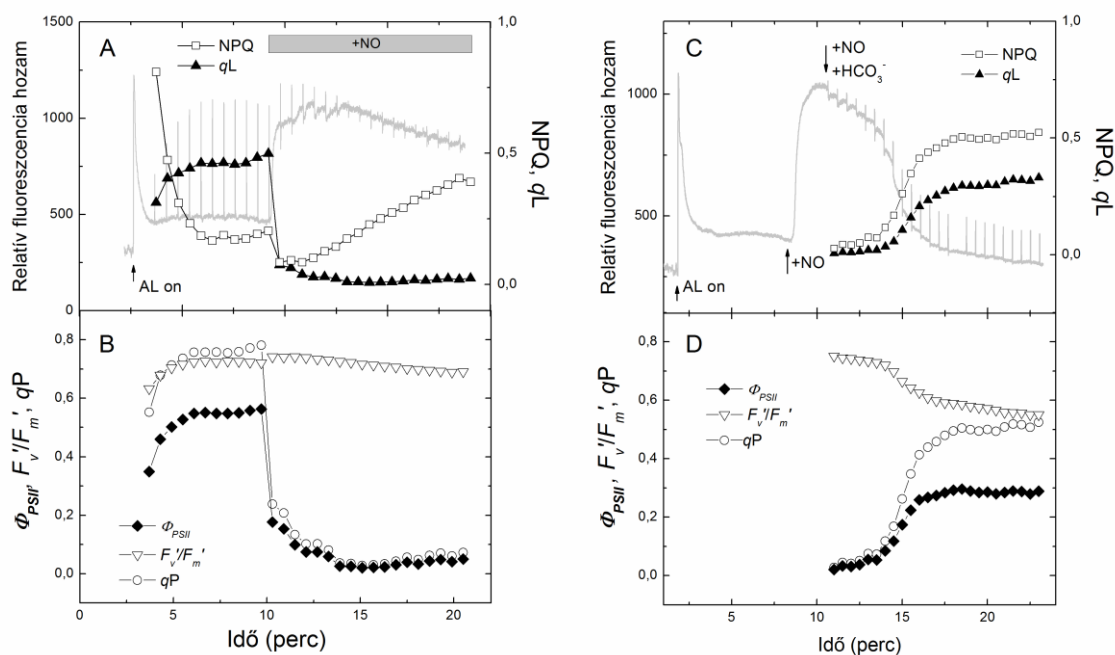
18. ábra A NO hatása a zárósejtek gyors fényválasz görbéire. Az 450 nM koncentrációjú NO kezelés a relatív fluoreszcencia hozam emelkedéséhez vezetett, ami a NO eltávolítása után helyreállt (A). Az  $F_v/F_m$  esetében csökkenést csak akkor tapasztaltunk, ha a sötét adaptációt megelőzően a NO kezelést megvilágítás mellett alkalmaztuk (B). A NO reverzibilisen csökkentette a  $\Phi_{PSII}$ ,  $q_P$ , NPQ és  $q_L$  paramétereket (C, E, F, G), valamint reverzibilisen megemelte az  $F_v'/F_m'$  paraméter értékét(D). Az ábrákon legalább 6 mérés átlagát ábrázoltuk, a szórások ( $\pm$ SD) feltüntetésével. A statisztikai elemzéshez a Student-féle t-próbát használtuk (\*\*\*)  $P < 0.001$ .

### 5.5.3 A NO ÁLTAL OKOZOTT VÁLTOZÁSOK KINETIKAI HÁTTERE

A NO hozzáadása illetve kimosása során a relatív fluoreszcencia hozam, illetve a fluoreszcencia paraméterek gyorsan változnak, azonban ennek kinetikáját korábban még nem vizsgálták. Ennek kiderítésére a fluoreszcens jelet gyenge,  $30 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  intenzitású AL mellett folyamatosan regisztráltuk, mindeközben a nyúzat fürdőoldatát egy gyors perfúziós rendszer segítségével változtattuk. A relatív fluoreszcencia hozam, a  $\Phi_{PSII}$ , az  $F_v'/F_m'$ , a  $qP$ , az NPQ és a  $qL$  paraméterek nagyjából 7 perc után elérték egyensúlyi értékeiket (19. ábra A, B). A 450 nM NO-t tartalmazó inkubációs oldattal történő átmosás után 1-2 percen belül a relatív fluoreszcencia meredek emelkedést mutatott, majd körülbelül 2-3 perc után elérte a maximumát és lassan csökkenni kezdett. Ez a meredek fluoreszcencia emelkedés a  $qP$ ,  $qL$  és az NPQ változó mértékű és kinetikájú csökkenésének köszönhető. Az NPQ körülbelül 1 perc után elérte a minimum értékét, majd lassú emelkedésbe kezdett, a  $\Phi_{PSII}$ , a  $qP$  és a  $qL$  viszont 3-5 perc alatt gyakorlatilag nullára csökkent, ezzel szemben az  $F_v'/F_m'$  enyhén emelkedett is. A  $qP$ -vel ellentétben, az NPQ gyors csökkenését egy lassú emelkedés követte, és ez áll összefüggésben a relatív fluoreszcencia hozam lassú csökkenésével a NO kezelést követő 3-5 percben (19. ábra, A, B).

### 5.5.4 A NO MELLÉ ADOTT BIKARBONÁT HELYREÁLLÍTTJA $qP$ -T ÉS FOKOZZA AZ NPQ KONSTANS EMELKEDÉSÉT

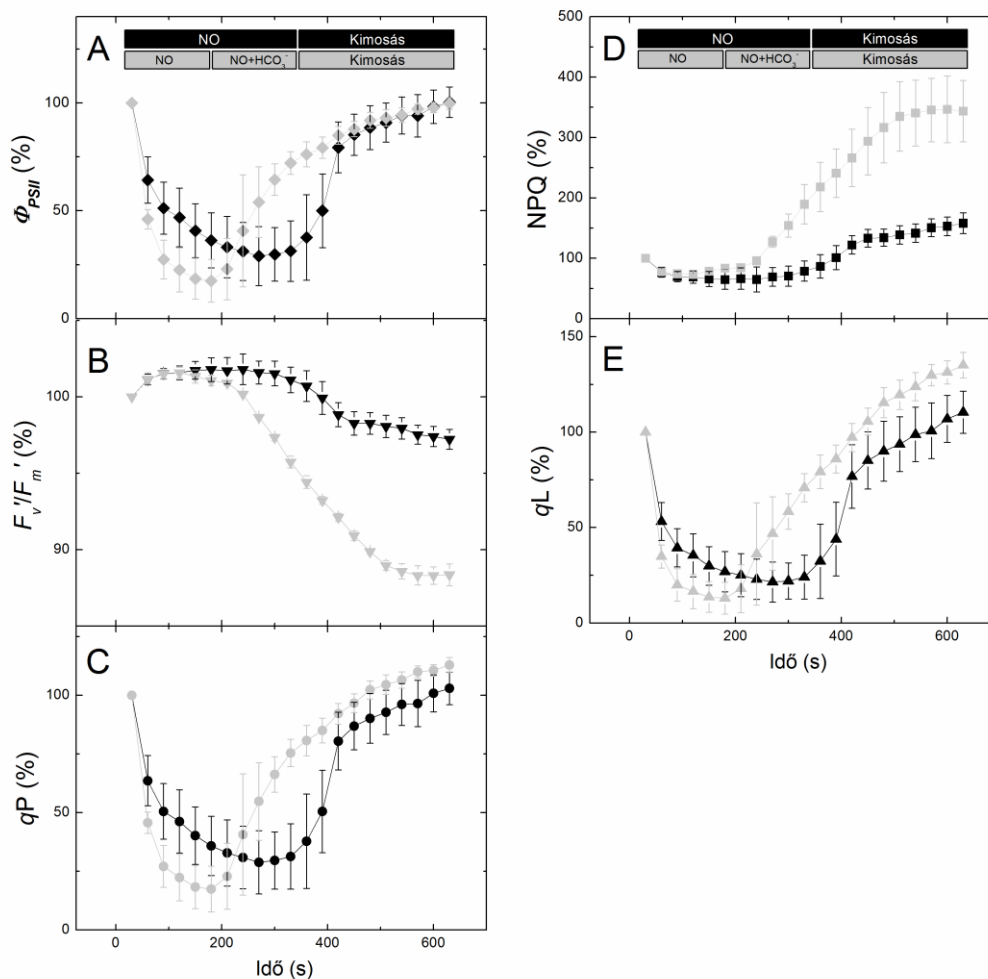
Korábbi eredmények szerint a NO a bikarbonátot a  $Q_A$  és  $Q_B$  kinonok közti nem-hem  $\text{Fe}^{2+}$  egyik koordinációs kötőhelyéért versengve leszorítja, és ezzel csökkenti az elektrontranszfer sebességét [178, 179]. A nyúzat fürdőoldatában a 450 nM NO-hoz adott kálium bikarbonát ( $\text{KHCO}_3$ ) koncentrációjának változtatásával úgy találtuk, hogy 10 mM még nem, de a 100 mM koncentrációban alkalmazott bikarbonát a fluoreszcencia hozamot nagy mértékben csökkenti miközben a  $\Phi_{PSII}$ , a  $qP$  és a  $qL$  paramétereket képes részben helyreállítani (19. ábra, C, D). Azt tapasztaltuk, hogy a bikarbonát a NO kezelés hatására enyhén emelkedő NPQ növekedését tovább erősíti, és ez áll a fluoreszcencia hozam további folytonos csökkenésének hátterében.



19. ábra Két jellemző mérés relatív fluoreszcencia hozama, NPQ,  $qL$ ,  $\Phi_{PSII}$ ,  $F_v'/F_m'$  és  $qP$  paramétereinek kinetikája NO valamint NO és bikarbonát kezelést követően. A paraméterek meghatározása 30 másodpercenként adott telítő fényimpulzus alkalmazásával történt. Az első kísérletben (A és B ábra)  $30 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  AL megvilágítás mellett a fotoszintézis egyensúlyi állapotának kialakulása után a sejtek körüli inkubációs oldat összetételét egy gyors perfúziós rendszerrel megváltoztattuk. Az A ábra tetején lévő szürke téglalap a  $450 \text{ nM NO}$ -t tartalmazó oldattal való átmosás időtartamát mutatja. A fluoreszcencia hozam meredek emelkedését az NPQ (A), a  $qL$  (A), a  $\Phi_{PSII}$  (B), az  $F_v'/F_m'$  (B) és a  $qP$  (B) paraméterek azonnali változása követi. A második kísérletben a NO hatására meredeken emelkedő relatív fluoreszcencia hozam maximumában a sejtürdőt  $450 \text{ nM NO} + 100 \text{ mM KHCO}_3$  tartalmú oldatra cseréltük.

#### 5.5.5. A FOTOSZINTETIKUS PARAMÉTEREK HELYREÁLLÍTHATÓSÁGA A NO-KEZELÉST KÖVETŐEN

A NO hozzáadását követően megvizsgáltuk, hogy mi történik akkor, ha a NO-t hirtelen eltávolítjuk a rendszerből. A gyors kimosás a  $\Phi_{PSII}$ , a  $qP$  és a  $qL$  paraméterek esetében 5 percen belül teljesen helyreállította a korábbi egyensúlyi értékeket, viszont az NPQ paraméter esetében csak annak növekedési ütemét csökkentette le. Az  $F_v'/F_m'$  esetében a NO okozta emelkedés a kimosást követően a kiindulási érték 97 %-ra állt vissza (20. ábra fekete szimbólumok). Amikor a NO + bikarbonátot tartalmazó oldatot NO- és bikarbonát-mentes oldatra cseréltük, a  $\Phi_{PSII}$ , a  $qP$ , az NPQ és a  $qL$  paraméterek növekedési üteme lassult (20. ábra szürke szimbólumok).



20.ábra A zárósejtek fotoszintetikus paramétereinek ( $\Phi_{PSII}$ ,  $qP$ , NPQ,  $F_v'/F_m'$  és  $qL$ ) változása az NO mellé adott bikarbonáttal, vagy anélkül. Az epidermisz nyúzatok környezetében az NO-mentes inkubációs oldatot, a  $30 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  AL megvilágítás mellett elért fotoszintetikus egyensúlyt követően, 450 nM NO-t tartalmazó oldatra cseréltük (fekete szimbólumok). Az újabb egyensúly elérése után az oldatot NO-mentes inkubációs oldatra cseréltük. A szürke szimbólumokkal jelzett görbék esetén a 450 nM NO tartalmú fürdőoldatot a jelzett időpontban 450 nM NO + 100 mM KHCO<sub>3</sub> tartalmú oldatra cseréltük. A kísérlet végén a nyúzatokat ebben az esetben is friss inkubációs oldattal mostuk át. A fotoszintetikus paramétereket a NO hozzáadása előtti egyensúlyi értékükre normáltuk (n=4,  $\pm$ SD)

## 5.6. A KITOZÁN, FELTEHETŐEN A NO BIOSZINTÉZISÉT INDUKÁLVA, GÁTOLJA A ZÁRÓSEJTEK FOTOSZINTETIKUS AKTIVITÁSÁT

A zárósejtek kloroplasztiszaiban működő lineáris elektrontranszportlánc működését és sztómaműködésben betöltött fontosságát számos tanulmány támasztja alá, mint ahogy ezt Lawson [87] munkájában részletesen összefoglalta.

A kísérleteink során készített RLC görbék alapján jól látható, hogy a hajnali 100  $\mu\text{g/ml}$  kitozán-kezelés hatására csökken az  $F_v/F_m$ , a  $\Phi_{PSII}$ , a  $qP$  és a  $qL$  fluoreszcencia paraméterek értéke. Ez jól korrelál a NO-donor GSNO-val való kezelés eredményével, ugyanis úgy tapasztaltuk, hogy NO hatására e paraméterek szintén csökkennek, mely a NO eltávolításával reverzibilisnek is bizonyult. A kezeléseket követően mind a kitozán, mind pedig a NO hatására magas relatív fluoreszcencia szinteket figyeltünk meg. A kitozán- és a NO-kezelések után a  $\Phi_{PSII}$  és az ETR paraméterek közötti egyenes arányosságot ismerve kijelenthetjük, hogy minden egyes alkalmazott AL esetében csökkent a PSII rendszeren keresztüli lineáris elektrontranszport sebessége, ami a zárósejtekben kevesebb ATP és NADPH mennyiséget, majd pedig ezen keresztül kisebb mértékű sztómányitódást eredményezhet.

A fotoszintetikus paraméterek közül egyedül az  $F_v'/F_m'$  esetében tapasztaltunk eltérést kitozán- és NO-kezelés kapcsán, ami a NO-kezelés hatására először megemelkedett, majd a kimosást követően lecsökkent a kiindulási kontroll értékekhez képest. A kitozán-kezelés hatására az  $F_v'/F_m'$  paraméter a NO kimosásánál tapasztalható csökkenést mutatta.

A napközbeni kitozán-kezelések során készített RLC görbék alapján kijelenthetjük, hogy a 100  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációban alkalmazott kitozán nem okozott szignifikáns változást az egyes fluoreszcencia paraméterek esetében. Ennek hátterében feltehetően a *Vicia faba* zárósejtekben a reaktív oxigén- és nitrogénformák már aktiválódott és jól működő enzimatis kioltódása állhat.

Részben irodalmi adatok alapján, részben saját kísérleteink eredményei alapján kijelenthetjük, hogy a NO a sztómaműködést, mint jelátvivő molekula, és mint a fotoszintetikus elektrontranszportlánc gátlószere egyaránt befolyásolja. A kitozán hatására indukálódó jelátvitel során, a NO-t, mint jelátvivő molekulát sikeresen azonosították borsóban [106], mi pedig bizonyítottuk, hogy az kitozán hatására megjelenik lóbab

zárósejtekben is. A hajnali kitozán-kezelés fotoszintézis gátló hatása mögött feltehetően az újonnan szintetizálódó NO áll. Ez azonban egy további kérdést vet föl: Miért nem tapasztaltunk fotoszintézis-gátlást a nappali kitozán-kezelések során? A kérdést valószínűleg a NO koncentráció-függő hatásával lehet legjobban megválaszolni. A NO-ról több esetben is beigazolódott, hogy hatásmechanizmusa koncentráció-függő [180]. A napközbeni kitozán-kezelés során a kloroplasztiszokban felhalmozódó NO koncentrációja feltehetően nem érte el azt a küszöbértéket, ami a fotoszintetikus elektrontranszportlánc működésének lassításához, gátlásához vagy a fehérjék PTM módosításaihoz (pl Calvin-ciklus gátlás) szükséges. Ennek oka a kioltó folyamatok jobb működése lehet, a kitozán-kezelés hatására termelődő kevesebb NO, vagy a kloroplasztiszokon belüli bikarbonát ionok koncentrációjának növekedése is. Az exogén NO kezelések során, kellően magas koncentráció (450 nM) esetén nem tapasztaltunk eltérést a hajnali és a napközbeni vizsgálatok eredményei között, azonban, ha jelentősen lecsökkentettük a NO koncentrációját (50 nM alá), akkor nem minden esetben volt megfigyelhető a lineáris elektrontranszportlánc teljes gátlása, sőt olykor nem is tapasztaltunk semmilyen változást (adatok bemutatása nélkül).

A zárósejtek saját szénfixálásából származó trióz-foszfátokból a kloroplasztiszokban keményítő, a citoszolban pedig néhány lépésben foszfoenol-piruvát képződik, melyből oxálecetsav, majd malát<sup>2-</sup> szintetizálódik [41]. A malát<sup>2-</sup> anionok a sztómányitódáskor nagy mennyiségben beáramló K<sup>+</sup> ionok ellenionjaként funkcionálnak, ebből következően szintén fontos ozmotikumok. Az ATP és a redukáló erő csökkenése eredményeképp trióz-foszfátok híján a kloroplasztiszban kevesebb keményítő, a citoszolban pedig kevesebb malát<sup>2-</sup> szintetizálódhat.

A K<sup>+</sup> és malát<sup>2-</sup> sztómányitódásban betöltött ozmotikus szerepét napközben a turgor fenntartásában fontos szacharóz veszi át. A kísérleteinkben használt *Vicia faba* növény zárósejtjeinek saját Calvin-Benson cikluson alapuló szacharóz bioszintézisét a vörös fény indukált sztómányitódást kutatva Talbott és Zeiger igazolta [181]. A Calvin-Benson ciklus rendelkezésére álló NADPH és ATP mennyiségének NO-függő csökkenése az ozmotikusan aktív szacharóz szintézisének visszaesését is eredményezheti. Malát<sup>2-</sup> és szacharóz a zárósejt keményítőjének hidrolíziséből származó szénvázból is képződik [182], ám a képződés mértéke ATP és redukáló erő hiányában szintén lecsökkenhet.

A fotofoszforiláció gátlása a PM H<sup>+</sup>-ATPázának aktiválásán alapuló kék fény indukált sztómányitódást csak kis mértékben érintheti. Ennek oka az, hogy a PM H<sup>+</sup>-ATPáz enzimet legnagyobb részben a mitokondriális ATP energizálja [42], a kloroplasztiszból származó ATP csak részben járul hozzá mindehhez [43].

Megállapíthatjuk tehát, hogy a NO sztómazáródásban betöltött jelátvivő szerepén kívül a zárósejtek turgorállapotát más úton is befolyásolja. Kimutattuk, hogy a zárósejtek fotoszintetikus elektrontranszportláncát reverzibilis módon gátolja, mellyel a sztómák nyitottságához szükséges ozmotikumok mennyiségét csökkentheti, és a PM H<sup>+</sup>-ATPázának aktivitását redukálhatja.

Egy gyors oldatcserélő rendszer alkalmazása lehetőséget kínált arra, hogy a NO hozzáadása és eltávolítása mellett a zárósejt fluoreszcencia paraméterek változásának kinetikáját is megvizsgáljuk.

A fluoreszcencia hozam a tálkában lévő oldat NO koncentrációjának növekedésével azonnal emelkedett (19. ábra). A fluoreszcencia hozam gyors emelkedése valószínűsíthetően nem a kloroplasztiszig nehezebben diffundálódó GSNO donor molekula a fehérjéket közvetlenül transz-nitroziláló hatásával, hanem a folyadékokban és a membránokon könnyen átdiffundálódó NO gáz hatásával hozható összefüggésbe.

A NO tartalmú oldat bevezetésével a megvilágított sztómák egyensúlyi fluoreszcencia paraméterei azonnal megváltoztak. Míg a fluoreszcencia hozam hirtelen emelkedése a *qP*, *qL* és NPQ gyors csökkenésével, a pár perc múlva bekövetkező lassú csökkenése az NPQ folytonos növekedésével áll összefüggésben.

A NO hozzáadására bekövetkező gyors NPQ csökkenés az elektrontranszportlánc sebességének csökkenésével mutat párhuzamot. Mivel ez utóbbi eredményeként a lumen kevésbé savanyodik, az NPQ kezdeti csökkenése annak leggyorsabb, *qE* energiafüggő nem-fotokémiai kioltási komponensének gyengülésével állhat összefüggésben. Megállapítottuk, hogy az epidermisz nyúzatok fürdőoldatának NO koncentrációját 450 nM felett tartva NPQ akár jóval a kiindulási steady-state értéke fölé is emelkedett, miközben AL intenzitását a kísérlet során nem változtattuk.

Vajon mi lehet az NPQ folytonos emelkedésének hátterében, és vajon mely komponense(i) okozhatják mindezt?



1. A  $qE$  komponens szerepe. Az NPQ emelkedése alacsony  $qP$  és  $\Phi_{PSII}$  értékek mellett történt. Az NPQ  $qE$  komponense a lumen savanyodásával növekszik. A savanyodás hátterében a protonok lumenbeli koncentrációját elősegítő erősödő ETR, vagy a kloroplasztisz ATP-szintáz enzimének csökkent aktivitása állhat. Eredményeink szerint ETR a NO eltávolításáig alacsony marad, így  $qE$  esetleges növekedése az ATP-t fogyasztó folyamatok gátlásával, azaz csökkenő ADP és inorganikus foszfát mennyiséggel, vagy az ATP-szintáz inaktiválásával állhat összefüggésben. *Arabidopsis*-ban kimutatták, hogy a Calvin-Benson ciklus Rubisco enzimének kis és nagy alegysége, valamint az ATP-szintáz CF1 alegysége NO gáz és GSNO kezelés hatására is S-nitrozilálódik [138]. Később *Kalanchoe pinnata* növény esetében *in vivo* és *in vitro* is bizonyítást nyert, hogy a Rubisco S-nitrozilációja NO koncentráció-függő módon a Rubisco aktivitásának gátlásával is jár [155]. A Calvin-Benson ciklus NO-függő gátlásának eredményeképp az ATP fogyasztás és az ATP-szintáz aktivitás csökken, így  $qE$  emelkedhet. Ezt erősíti az a kísérleti tapasztalat is, melyben a NO kezelés után a NO mellé bikarbonátot adtunk (19. ábra, C, D). A bikarbonát megfelelően nagy koncentrációban a NO-ot a  $Q_A$  és  $Q_B$  kinonok közti nem-hem  $Fe^{2+}$  egyik koordinációs kötőhelyéről leszorítja, így a kinonok közti töltésátadás sebessége felgyorsulhat [179]. A bikarbonát NO mellé adásával azt tapasztaltuk, hogy a  $qP$  és  $\Phi_{PSII}$ , így az ETR paraméterek hirtelen növekedtek, mellyel párhuzamosan az NPQ is gyorsan emelkedni kezdett, ami a Calvin-Benson ciklus továbbiakban is fennálló NO-függő gátlására utalhat (19. ábra, C, D). Mivel a NO mellé adott bikarbonát a  $qP$  és  $\Phi_{PSII}$  paramétert majdnem teljes mértékben helyreállította azt is megállapíthatjuk, hogy a NO lineáris elektrontranszportlánc gátlását túlnyomó részben a bikarbonát  $Q_A$  és  $Q_B$  közti nem-hem  $Fe^{2+}$ -ról való leszorítása okozta.

A bikarbonát ionok, a NO nem-hem (II) vasról történő leszorításán kívül egyéb módon is hozzájárulhat a fotoszintetikus aktivitás serkentéséhez. A szén-sav-anhidrázok működése révén  $CO_2$  felszabadulás figyelhető meg a bikarbonát kezelés során, ami a Calvin-Benson ciklus működését serkentheti [183]. Habár az NPQ erős emelkedése a NO-kezelést követően inkább azt bizonyítja, hogy a 450 nM NO gátló hatása jobban érvényesül, mint a 100 mM bikarbonátból keletkező  $CO_2$  serkentő hatása. Ezenfelül Kolla és Raghavendra [175, 176] kimutatta, hogy a bikarbonát-kezelés NO és  $H_2O_2$  keletkezését indukálta borsó és *Arabidopsis thaliana* növények zárósejtjeiben. A bikarbonát ionok indukálta NO-nak azonban feltehetően nem volt további hatása a kísérleti rendszerünkben, ugyanis kísérleteink során NO-t is alkalmaztunk a bikarbonát ionok mellett.

2. A fotoinhibíciós kioltás ( $qI$ ) komponens szerepe. Míg a sötétben alkalmazott NO az  $F_v/F_m$  paramétert érdekes módon nem befolyásolta (18. ábra, B), addig megvilágított mintákat kezelve csökkentette azt. Tapasztalatunk ellentétben áll Takahashi and Yamasaki [151] izolált tilakoid membránokon kapott eredményeivel, ám megegyezik más, intakt levélen végzett kísérletekével [147, 184].  $F_v/F_m$  csökkenése  $qI$  megjelenésére utalhat, mivel a paraméter meghatározása előtti 15 perces sötétadaptáció elegendő lenne a  $qE$  helyreállításához. Vajon mitől növekedhet a  $qI$ ? Jasid és munkatársai [117] megállapították, hogy míg a NO önmagában a kloroplasztisz lipidek és fehérjék oxidációjának kivédésével protektív hatású, addig a NO és  $O_2^{\cdot-}$  reakciójából még fiziológias körülmények között kis mennyiségben is keletkező ONOO<sup>-</sup> oxidatív sérülések forrása lehet. Úgy találták, hogy magas NO koncentrációk esetén a ONOO<sup>-</sup> felszaporodhat és a kloroplasztiszokban erősödő lipid peroxidációhoz, a sztróma- és tilakoid fehérjék oxidációjához és sérült fotoszintetikus elektrontranszferhez vezet.

A NO a mitokondriális citokróm *c* oxidázt gátló hatásával a  $O_2^{\cdot-}$  mennyiségét is emeli [185], és a képződő ONOO<sup>-</sup> a kloroplasztiszokba diffundálhat. A  $O_2^{\cdot-}$  kloroplasztiszban vett mennyiségének további növekedését a NO Calvin-Benson ciklust gátló hatása [155, 186], és evvel a PSI-ben az  $O_2$  fotoredukciójának erősödése okozhatja. Ebből következően a kísérletünkben 450 nM koncentrációban külsőleg alkalmazott NO esetén megvilágítás hatására a kloroplasztiszban ONOO<sup>-</sup> szaporodhatott fel, mely magyarázatot ad arra, hogy az  $F_v/F_m$  csökkenést a sötétben végzett NO kezeléskor nem, csak a megvilágított minták NO kezelésekor tapasztaltuk.

A fotosérülés mértékét a NO gyors eltávolítása mellett vizsgált fluoreszcencia paraméterek helyreállításával becsülhetjük. Megállapítottuk, hogy ha a NO kezelésre a kloroplasztiszokban ugyan képződött is ONOO<sup>-</sup>, mivel  $qP$  és  $\Phi_{PSII}$  a NO kimosásával helyreállt, annak mennyisége az alkalmazott alacsony AL fényintenzitás mellett nem volt elegendő a lineáris elektrontranszportlánc irreverzibilis károsításához (19. ábra).

Az NPQ értéke még a NO kimosása előtt az egyensúlyi NPQ szintje fölé emelkedett, mely emelkedés a kimosással szinte teljesen eltűnt. NPQ növekedése tehát NO és a megvilágítás együttes jelenlétében következik be. A NO és fény hatására képződő Stern-Volmer quencher koncentráció egy néhány perces időtartamban sem a NO kimosásával sem a megvilágítás kikapcsolásával ( $F_v/F_m$  nem áll helyre, adatok bemutatása nélkül) nem csökken.

## 6. KONKLÚZIÓ

A kitozán, a  $\beta$ -1,4-glükózamin láncokból felépülő gomba sejtfalalkotó molekula kék fény-indukált sztómányitódás-gátló, és sztómazáródást serkentő hatását több növényfaj esetében bizonyították. A sztómányitódáshoz és záródáshoz vezető jelátviteli útvonalak és az ionáramlást irányító transzporterek szerteágazó hálózatát a kitozán több ponton befolyásolhatja. Kísérleteink során e hatás igazolását tűztük ki célul *Vicia faba L.* modellnövény esetén.

1. Elsőként igazoltuk, hogy *Vicia faba* esetében a levelek kitozánnal történő permetezése nem indukált sztómazáródást, azonban a sztómányitódást meggátolta. Mivel ezen eredmények az irodalomból ismert korábbi eredményeknek csak részben feleltethetők meg, így további kísérletek során a kitozán hatására aktiválódó jelátviteli komponensek megjelenését is megvizsgáltuk. Specifikus fluoreszcens jelölők segítségével szintén elsőként igazoltuk, hogy a  $H_2O_2$  és a  $NO$ , mint jelátvivő molekulák a *Vicia faba* zárósejtek kloroplasztiszaiban a kitozánkezelést követő 1 órán belül felhalmozódtak. Szintén elsőként térünk ki arra, hogy érdekes módon a  $H_2O_2$  felhalmozódás feltehetően elsősorban a kloroplasztiszok sztrómájában és a sejtmagokban volt megfigyelhető, míg a  $NO$  a kloroplasztiszokon kívül a citoplazmában és pórus körüli sejtfalakban is megjelent.
2. Abaxiális epidermisz nyúzatok alkalmazásával hasonló eredményeket kaptunk, melyek segítségével ki tudtuk zárni a mezofillum sejtek kitozán indukált sztómamozgásokban betöltött szerepét.
3. Mivel a sztómák nyitódásában és a nyitott állapot fenntartásában a fotoszintetikus eredetű ATP és NADPH fontos szerepet tölt be, ezért a kitozán zárósejtek fotoszintetikus aktivitására gyakorolt hatását is megvizsgáltuk. Az abaxiális epidermiszben található zárósejtek fotoszintetikus aktivitását PAM klorofill fluorimetriás módszerrel tanulmányoztuk. Kísérleteink során új eredményként azt tapasztaltuk, hogy a hajnalban kezelt növények zárósejtjeiben jelentősen lecsökkent a PSII rendszeren keresztüli ETR értéke, ami a kontroll növényekhez képest a nap hátralevő részében is alacsony maradt. A fotokémiai kioltási együtthatók ( $qP$  és  $qL$ ), a  $\Phi_{PSII}$  és az NPQ más és más kinetikát mutatva ugyan, de szintén teljesen

lecsökkentek. Érdekes módon a napközbeni kitozán-kezelések során egyik paraméter esetében sem tapasztaltunk hasonló változást.

4. Mivel a kitozán zárósejtek fotoszintézisére gyakorolt hatását feltehetően a sejtfelszíni receptorok által indukált jelátviteli utak révén fejtheti ki, megvizsgáltuk a már korábban igazolt jelátviteli komponensek ( $\text{H}_2\text{O}_2$  és NO) esetleges fotoszintézisre gyakorolt hatását is. Míg a  $\text{H}_2\text{O}_2$  esetében nem tapasztaltuk a kitozán-kezelésre jellemző változásokat, a nagy koncentrációban külsőleg alkalmazott NO esetében a kitozán-kezeléshez nagyon hasonló gátlást figyeltünk meg mind az ETR, a  $qP$ ,  $qL$ , a  $\Phi_{PSII}$ , és az NPQ esetében is. Az irodalomban először igazoltuk, hogy a NO-kezelés hatása reverzibilisnek mutatkozott, ugyanis a NO sejtek környezetéből történő gyors eltávolítása révén az egyes fluoreszcencia paraméterek a kiindulási értékeikre tértek vissza. A NO lineáris elektrontranszportláncot gátló hatása megfelelően nagy koncentrációjú bikarbonáttal feloldható. Az eredmény arra utal, hogy gátlást túlnyomó részben az okozza, hogy a NO a vele a kötőhelyért versengő bikarbonátot a  $Q_A$  és  $Q_B$  közti nem-hem  $\text{Fe}^{2+}$ -ról leszorítja.

Fontos azonban azt is megjegyezni, hogy a kitozán hatására történő sztómazáródás következtében a levelek belsejében a  $\text{CO}_2$  koncentrációja lecsökkenhet, így a kitozán a Calvin-Benson ciklus lassításával is hozzájárulhat a zárósejtek fotoszintetikus aktivitásának csökkenéséhez.

A kapott eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a kitozán feltehetőleg a NO bioszintézisének aktiválásán keresztül a zárósejtek fotoszintézisét gátolja, ezáltal a fotoszintetikus eredetű ATP és a NADPH mennyiségét csökkenti, mely a sztómanyitódás elmaradásához és a sztómazáródás folyamatának elősegítéséhez egyaránt hozzájárulhat.

Munkánk eredményei hozzájárulnak a kitozán, mint MAMP zárósejtekben indukált jelátviteli folyamatainak és hatásmechanizmusának megértéséhez. Az irodalomban először vizsgáltuk a NO zárósejtek fotoszintézisére gyakorolt hatását, illetve először mutattuk ki *in vivo* a NO reverzibilis fotoszintézis gátló szerepét. Remélem, hogy a biotikus stressz kutatásában a zárósejtek működésének mélyebb megismerése, az önálló fotoszintetikus aktivitásának fontos szerepe és stressz alatti szabályozásának megértése dolgozatom eredményeivel tovább bővíthet.

## 7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Berendsen RL, Pieterse CM, Bakker PA: **The rhizosphere microbiome and plant health.** *Trends Plant Sci* 2012, **17**(8):478-486.
2. Zamioudis C, Pieterse CM: **Modulation of host immunity by beneficial microbes.** *Mol Plant Microbe Interact* 2012, **25**(2):139-150.
3. Pel MJ, Pieterse CM: **Microbial recognition and evasion of host immunity.** *J Exp Bot* 2013, **64**(5):1237-1248.
4. Nurnberger T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L: **Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences.** *Immunol Rev* 2004, **198**:249-266.
5. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: **Pathogen recognition and innate immunity.** *Cell* 2006, **124**(4):783-801.
6. Spoel SH, Dong X: **How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells.** *Nat Rev Immunol* 2012, **12**(2):89-100.
7. Boller T, Felix G: **A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors.** *Annu Rev Plant Biol* 2009, **60**:379-406.
8. Jones JD, Dangl JL: **The plant immune system.** *Nature* 2006, **444**(7117):323-329.
9. Monaghan J, Zipfel C: **Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane.** *Curr Opin Plant Biol* 2012, **15**(4):349-357.
10. Woloshen V, Huang S, Li X: **RNA-Binding Proteins in Plant Immunity.** *J Pathog* 2011, **2011**:278697.
11. Shibuya N, Minami E: **Oligosaccharide signalling for defence responses in plant.** *Physiol Mol Plant P* 2001, **59**(5):223-233.
12. Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiyama C, Dohmae N, Takio K, Minami E, Shibuya N: **Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(29):11086-11091.
13. Shimizu T, Nakano T, Takamizawa D, Desaki Y, Ishii-Minami N, Nishizawa Y, Minami E, Okada K, Yamane H, Kaku H *et al*: **Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice.** *Plant J* 2010, **64**(2):204-214.
14. Petutschnig EK, Jones AM, Serazetdinova L, Lipka U, Lipka V: **The lysin motif receptor-like kinase (LysM-RLK) CERK1 is a major chitin-binding protein in *Arabidopsis thaliana* and subject to chitin-induced phosphorylation.** *J Biol Chem* 2010, **285**(37):28902-28911.
15. Liu T, Liu Z, Song C, Hu Y, Han Z, She J, Fan F, Wang J, Jin C, Chang J *et al*: **Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor.** *Science* 2012, **336**(6085):1160-1164.
16. Zhang B, Ramonell K, Somerville S, Stacey G: **Characterization of early, chitin-induced gene expression in *Arabidopsis*.** *Mol Plant Microbe Interact* 2002, **15**(9):963-970.
17. Wan J, Tanaka K, Zhang XC, Son GH, Brechenmacher L, Nguyen TH, Stacey G: **LYK4, a lysin motif receptor-like kinase, is important for chitin signaling and plant innate immunity in *Arabidopsis*.** *Plant Physiol* 2012, **160**(1):396-406.
18. Edwards D, Kerp H, Hass H: **Stomata in early land plants: an anatomical and ecophysiological approach.** *J Exp Bot* 1998, **49**:255-278.
19. Edwards D, Davies KL, Axe L: **A Vascular Conducting Strand in the Early Land Plant *Cooksonia*.** *Nature* 1992, **357**(6380):683-685.
20. Raschke K, Fellows MP: **Stomatal movement in *Zea mays*: Shuttle of potassium and chloride between guard cells and subsidiary cells.** *Planta* 1971, **101**(4):296-316.
21. Cowan IR, Troughton JH: **The relative role of stomata in transpiration and assimilation.** *Planta* 1971, **97**(4):325-336.

22. Lee S, Choi H, Suh S, Doo IS, Oh KY, Choi EJ, Schroeder Taylor AT, Low PS, Lee Y: **Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*.** *Plant Physiol* 1999, **121**(1):147-152.
23. Klusener B, Young JJ, Murata Y, Allen GJ, Mori IC, Hugouvieux V, Schroeder JI: **Convergence of calcium signaling pathways of pathogenic elicitors and abscisic acid in *Arabidopsis* guard cells.** *Plant Physiol* 2002, **130**(4):2152-2163.
24. Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY: **Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion.** *Cell* 2006, **126**(5):969-980.
25. Lloyd FE: **The physiology of stomata.** *Publication of the Carnegie Institution of Washington* 1908, **82**.
26. Fischer RA, Hsiao TC: **Stomatal Opening in Isolated Epidermal Strips of *Vicia faba*. II. Responses to KCl Concentration and the Role of Potassium Absorption.** *Plant Physiol* 1968, **43**(12):1953-1958.
27. Fischer RA: **Stomatal opening: role of potassium uptake by guard cells.** *Science* 1968, **160**(3829):784-785.
28. Yamashita T: **Influences of potassium supply upon various properties and movement of guard cell.** *Sielboldia Acta Biologica* 1952, **1**:51-70.
29. Raschke K: **Stomatal Action.** *Annu Rev Plant Phys* 1975, **26**:309-340.
30. Raschke K: **Movement of stomata.** *Encyclopedia of plant physiology, Vol 7: physiology of movements* 1979:387-411.
31. MacRobbie EAC, Lettau J: **Potassium Content and Aperture in Intact Stomatal and Epidermal-Cells of *Commelina communis* L.** *J Membrane Biol* 1980, **56**(3):249-256.
32. MacRobbie EAC, Lettau J: **Ion Content and Aperture in Isolated Guard-Cells of *Commelina-Communis* L.** *J Membrane Biol* 1980, **53**(3):199-205.
33. Outlaw WH, Manchester J: **Guard cell starch concentration quantitatively related to stomatal aperture.** *Plant Physiol* 1979, **64**(1):79-82.
34. Outlaw WH: **Current Concepts on the Role of Potassium in Stomatal Movements.** *Physiol Plantarum* 1983, **59**(2):302-311.
35. Reddy AR, Das VSR: **Stomatal Movement and Sucrose Uptake by Guard-Cell Protoplasts of *Commelina benghalensis* L.** *Plant Cell Physiol* 1986, **27**(8):1565-1570.
36. Talbott LD, Zeiger E: **The role of sucrose in guard cell osmoregulation.** *J Exp Bot* 1998, **49**:329-337.
37. Talbott LD, Zeiger E: **Sugar and Organic Acid Accumulation in Guard Cells of *Vicia faba* in Response to Red and Blue Light.** *Plant Physiol* 1993, **102**(4):1163-1169.
38. Talbott LD, Zeiger E: **Central Roles for Potassium and Sucrose in Guard-Cell Osmoregulation.** *Plant Physiol* 1996, **111**(4):1051-1057.
39. Shimazaki K, Iino M, Zeiger E: **Blue Light-Dependent Proton Extrusion by Guard-Cell Protoplasts of *Vicia faba*.** *Nature* 1986, **319**(6051):324-326.
40. Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D: **Guard cell signal transduction.** *Annu Rev Plant Phys* 2001, **52**:627-658.
41. Shimazaki KI, Doi M, Assmann SM, Kinoshita T: **Light regulation of stomatal movement.** *Annu Rev Plant Biol* 2007, **58**:219-247.
42. Parvathi K, Raghavendra AS: **Bioenergetic processes in guard cells related to stomatal function.** *Physiol Plantarum* 1995, **93**(1):146-154.
43. Mawson BT: **Regulation of blue-light-induced proton pumping by *Vicia faba* L. guard-cell protoplasts: Energetic contributions by chloroplastic and mitochondrial activities.** *Planta* 1993, **191**(3):293-301.
44. Schroeder JI, Hagiwara S: **Repetitive Increases in Cytosolic Ca<sup>2+</sup> of Guard-Cells by Abscisic-Acid Activation of Nonselective Ca<sup>2+</sup> Permeable Channels.** *P Natl Acad Sci USA* 1990, **87**(23):9305-9309.
45. Gilroy S, Read ND, Trewavas AJ: **Elevation of Cytoplasmic Calcium by Caged Calcium or Caged Inositol Trisphosphate Initiates Stomatal Closure.** *Nature* 1990, **346**(6286):769-771.

46. Kinoshita T, Nishimura M, Shimazaki KI: **Cytosolic concentration of Ca<sup>2+</sup> regulates the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in guard cells of fava bean.** *Plant Cell* 1995, **7**(8):1333-1342.
47. Schroeder JI, Hagiwara S: **Cytosolic Calcium Regulates Ion Channels in the Plasma-Membrane of *Vicia faba* Guard-Cells.** *Nature* 1989, **338**(6214):427-430.
48. Ward JM, Pei ZM, Schroeder JI: **Roles of Ion Channels in Initiation of Signal-Transduction in Higher-Plants.** *Plant Cell* 1995, **7**(7):833-844.
49. Schmidt C, Schelle I, Liao YJ, Schroeder JI: **Strong Regulation of Slow Anion Channels and Abscisic-Acid Signaling in Guard-Cells by Phosphorylation and Dephosphorylation Events.** *P Natl Acad Sci USA* 1995, **92**(21):9535-9539.
50. De Angeli A, Thomine S, Frachisse JM, Ephritikhine G, Gambale F, Barbier-Brygoo H: **Anion channels and transporters in plant cell membranes.** *FEBS Lett* 2007, **581**(12):2367-2374.
51. Cohen P: **The Structure and Regulation of Protein Phosphatases.** *Annu Rev Biochem* 1989, **58**:453-508.
52. Horváth F, Erdei L, Wodala B, Homann U, Thiel G: **K<sup>+</sup> outward rectifying channels as targets of phosphatase inhibitor deltamethrin in *Vicia faba* guard cells.** *J Plant Physiol* 2002, **159**(10):1097-1103.
53. Luan S, Li WW, Rusnak F, Assmann SM, Schreiber SL: **Immunosuppressants Implicate Protein Phosphatase Regulation of K<sup>+</sup> Channels in Guard-Cells.** *P Natl Acad Sci USA* 1993, **90**(6):2202-2206.
54. Hey SJ, Bacon A, Burnett E, Neill SJ: **Abscisic acid signal transduction in epidermal cells of *Pisum sativum* L. *Argenteum*: Both dehydrin mRNA accumulation and stomatal responses require protein phosphorylation and dephosphorylation.** *Planta* 1997, **202**(1):85-92.
55. Thiel G, Blatt MR: **Phosphatase Antagonist Okadaic Acid Inhibits Steady-State K<sup>+</sup> Currents in Guard-Cells of *Vicia faba*.** *Plant J* 1994, **5**(5):727-733.
56. Li WW, Luan S, Schreiber SL, Assmann SM: **Evidence for Protein Phosphatase-1 and Phosphatase-2a Regulation of K<sup>+</sup> Channels in 2 Types of Leaf-Cells.** *Plant Physiol* 1994, **106**(3):963-970.
57. Berkowitz G, Zhang X, Mercier R, Leng Q, Lawton M: **Co-expression of calcium-dependent protein kinase with the inward rectified guard cell K<sup>+</sup> channel KAT1 alters current parameters in *Xenopus laevis* oocytes.** *Plant Cell Physiol* 2000, **41**(6):785-790.
58. Li JX, Assmann SM: **An abscisic acid-activated and calcium-independent protein kinase from guard cells of fava bean.** *Plant Cell* 1996, **8**(12):2359-2368.
59. Jammes F, Song C, Shin D, Munemasa S, Takeda K, Gu D, Cho D, Lee S, Giordo R, Sritubtim S *et al*: **MAP kinases MPK9 and MPK12 are preferentially expressed in guard cells and positively regulate ROS-mediated ABA signaling.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(48):20520-20525.
60. Wang P, Du Y, Li Y, Ren D, Song CP: **Hydrogen peroxide-mediated activation of MAP kinase 6 modulates nitric oxide biosynthesis and signal transduction in Arabidopsis.** *Plant Cell* 2010, **22**(9):2981-2998.
61. Jiang J, Wang P, An G, Wang P, Song CP: **The involvement of a P38-like MAP kinase in ABA-induced and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated stomatal closure in *Vicia faba* L.** *Plant Cell Rep* 2008, **27**(2):377-385.
62. Lawson T, Oxborough K, Morison JIL, Baker NR: **The responses of guard and mesophyll cell photosynthesis to CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, light, and water stress in a range of species are similar.** *J Exp Bot* 2003, **54**(388):1743-1752.
63. Humble GD, Raschke K: **Stomatal opening quantitatively related to potassium transport: evidence from electron probe analysis.** *Plant Physiol* 1971, **48**(4):447-453.
64. Stevens RA, Martin ES: **Structural and functional aspects of stomata : I. Developmental studies in *Polypodium vulgare*.** *Planta* 1978, **142**(3):307-316.
65. Nelson SD, Mayo JM: **Occurrence of Functional Non-Chlorophyllous Guard Cells in *Paphiopedilum* spp.** *Can J Bot* 1975, **53**(1):1-7.

66. Rutter JM, Willmer, C.M.: **A light and electron microscopy study of the epidermis of *Paphiopedilum* spp. with emphasis on stomatal ultrastructure.** *Plant, Cell & Environment* 1979, **2**:211–219.
67. D'Amelio ED, Zeiger, E.: **Diversity of guard cell plastids of the Orchidaceae: a structural and functional study.** *Can J Bot* 1988, **66**:257–271.
68. Sack FD: **The development and structure of stomata.** *Stomatal function, Stanford University Press* 1987:59–90.
69. Shimazaki KI, Okayama S: **Calvin Benson Cycle Enzymes in Guard-Cell Protoplasts and Their Role in Stomatal Movement.** *Biochem Physiol Pfl* 1990, **186**(5-6):327-331.
70. Stadler R, Buttner M, Ache P, Hedrich R, Ivashikina N, Melzer M, Shearson SM, Smith SM, Sauer N: **Diurnal and light-regulated expression of AtSTP1 in guard cells of *Arabidopsis*.** *Plant Physiol* 2003, **133**(2):528-537.
71. Willmer CM, Fricker, M.: **Stomata, 2nd edn.** *Chapman & Hall* 1996.
72. Tominaga M, Kinoshita T, Shimazaki K: **Guard-cell chloroplasts provide ATP required for H<sup>+</sup> pumping in the plasma membrane and stomatal opening.** *Plant Cell Physiol* 2001, **42**(8):795-802.
73. Schwartz A, Zeiger E: **Metabolic Energy for Stomatal Opening - Roles of Photophosphorylation and Oxidative-Phosphorylation.** *Planta* 1984, **161**(2):129-136.
74. Shimazaki K, Zeiger E: **Cyclic and Noncyclic Photophosphorylation in Isolated Guard Cell Chloroplasts from *Vicia faba* L.** *Plant Physiol* 1985, **78**(2):211-214.
75. Frechilla S, Zhu JX, Talbott LD, Zeiger E: **Stomata from npq1, a zeaxanthin-less *Arabidopsis* mutant, lack a specific response to blue light.** *Plant Cell Physiol* 1999, **40**(9):949-954.
76. Zeiger E: **Sensory transduction of blue light in guard cells.** *Trends Plant Sci* 2000, **5**(5):183-185.
77. Tallman G, Zeiger E: **Light Quality and Osmoregulation in *Vicia* Guard-Cells - Evidence for Involvement of 3 Metabolic Pathways.** *Plant Physiol* 1988, **88**(3):887-895.
78. Zeiger E, Talbott LD, Frechilla S, Srivastava A, Zhu JX: **The guard cell chloroplast: a perspective for the twenty-first century.** *New Phytol* 2002, **153**(3):415-424.
79. Zeiger E, Armond, P., Melis, P.: **Fluorescence properties of guard cell chloroplasts: evidence for linear electron transport and light harvesting pigments of photosystem I and II.** *Plant Physiol Bioch* 1980, **67**:17–20.
80. Outlaw WH, Mayne BC, Zenger VE, Manchester J: **Presence of Both Photosystems in Guard-Cells of *Vicia faba* L Implications for Environmental Signal-Processing.** *Plant Physiol* 1981, **67**(1):12-16.
81. Shimazaki KI, Gotow K, Kondo N: **Photosynthetic Properties of Guard-Cell Protoplasts from *Vicia faba* L.** *Plant Cell Physiol* 1982, **23**(5):871-879.
82. Hipkins MF, Fitzsimons PJ, Weyers JDB: **The Primary Processes of Photosystem-II in Purified Guard-Cell Protoplasts and Mesophyll-Cell Protoplasts from *Commelina communis* L.** *Planta* 1983, **159**(6):554-560.
83. Lurie S: **Photochemical Properties of Guard Cell Chloroplasts.** *Plant Sci Lett* 1977, **10**(3):219-223.
84. Cardon ZG, Berry J: **Effects of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> Concentration on the Steady-State Fluorescence Yield of Single Guard-Cell Pairs in Intact Leaf-Disks of *Tradescantia albiflora* - Evidence for Rubisco-Mediated CO<sub>2</sub> Fixation and Photorespiration in Guard-Cells.** *Plant Physiol* 1992, **99**(3):1238-1244.
85. Goh CH, Schreiber U, Hedrich R: **New approach of monitoring changes in chlorophyll a fluorescence of single guard cells and protoplasts in response to physiological stimuli.** *Plant Cell Environ* 1999, **22**(9):1057-1070.
86. Lawson T, Oxborough K, Morison JIL, Baker NR: **Responses of photosynthetic electron transport in stomatal guard cells and mesophyll cells in intact leaves to light, CO<sub>2</sub>, and humidity.** *Plant Physiol* 2002, **128**(1):52-62.
87. Lawson T: **Guard cell photosynthesis and stomatal function.** *New Phytol* 2009, **181**(1):13-34.



88. Stohr C, Ullrich WR: **Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space.** *J Exp Bot* 2002, **53**(379):2293-2303.
89. Mur LAJ, Carver TLW, Prats E: **NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions.** *J Exp Bot* 2006, **57**(3):489-505.
90. Lamattina L, Garcia-Mata C, Graziano M, Pagnussat G: **Nitric oxide: The versatility of an extensive signal molecule.** *Annu Rev Plant Biol* 2003, **54**:109-136.
91. Murgia I, de Pinto MC, Delledonne M, Soave C, De Gara L: **Comparative effects of various nitric oxide donors on ferritin regulation, programmed cell death, and cell redox state in plant cells.** *J Plant Physiol* 2004, **161**(7):777-783.
92. Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D: **New insights into nitric oxide signaling in plants.** *Annu Rev Plant Biol* 2008, **59**:21-39.
93. Simontacchi M, Garcia-Mata C, Bartoli CG, Santa-Maria GE, Lamattina L: **Nitric oxide as a key component in hormone-regulated processes.** *Plant Cell Rep* 2013, **32**(6):853-866.
94. Delledonne M, Xia YJ, Dixon RA, Lamb C: **Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance.** *Nature* 1998, **394**(6693):585-588.
95. Clarke A, Desikan R, Hurst RD, Hancock JT, Neill SJ: **NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures.** *Plant J* 2000, **24**(5):667-677.
96. Mur LAJ, Santosa IE, Laarhoven LJJ, Holton NJ, Harren FJM, Smith AR: **Laser photoacoustic detection allows in planta detection of nitric oxide in tobacco following challenge with avirulent and virulent *Pseudomonas syringae* pathovars.** *Plant Physiol* 2005, **138**(3):1247-1258.
97. Prats E, Mur LA, Sanderson R, Carver TL: **Nitric oxide contributes both to papilla-based resistance and the hypersensitive response in barley attacked by *Blumeria graminis f. sp. hordei*.** *Mol Plant Pathol* 2005, **6**(1):65-78.
98. Manjunatha G, Niranjana-Raj S, Prashanth GN, Deepak S, Amruthesh KN, Shetty HS: **Nitric oxide is involved in chitosan-induced systemic resistance in pearl millet against downy mildew disease.** *Pest management science* 2009, **65**(7):737-743.
99. Mur LA, Sivakumaran A, Mandon J, Cristescu SM, Harren FJ, Hebelstrup KH: **Haemoglobin modulates salicylate and jasmonate/ethylene-mediated resistance mechanisms against pathogens.** *J Exp Bot* 2012, **63**(12):4375-4387.
100. Boccara M, Mills CE, Zeier J, Anzi C, Lamb C, Poole RK, Delledonne M: **Flavo-haemoglobin HmpX from *Erwinia chrysanthemi* confers nitrosative stress tolerance and affects the plant hypersensitive reaction by intercepting nitric oxide produced by the host.** *Plant J* 2005, **43**(2):226-237.
101. Baudouin E, Pieuchot L, Engler G, Pauly N, Puppo A: **Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* functional nodules.** *Mol Plant Microbe Interact* 2006, **19**(9):970-975.
102. Beligni MV, Lamattina L: **Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants.** *Nitric Oxide-Biol Ch* 1999, **3**(3):199-208.
103. Turrion-Gomez JL, Benito EP: **Flux of nitric oxide between the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* and the host plant.** *Mol Plant Pathol* 2011, **12**(6):606-616.
104. Hancock JT, Neill SJ, Wilson ID: **Nitric oxide and ABA in the control of plant function.** *Plant Sci* 2011, **181**(5):555-559.
105. Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hancock JT: **Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells.** *Plant Physiol* 2002, **128**(1):13-16.
106. Srivastava N, Gonugunta VK, Puli MR, Raghavendra AS: **Nitric oxide production occurs downstream of reactive oxygen species in guard cells during stomatal closure induced by chitosan in abaxial epidermis of *Pisum sativum*.** *Planta* 2009, **229**(4):757-765.
107. Ma W, Berkowitz GA: **Ca<sup>2+</sup> conduction by plant cyclic nucleotide gated channels and associated signaling components in pathogen defense signal transduction cascades.** *New Phytol* 2011, **190**(3):566-572.
108. Cheval C, Aldon D, Galaud JP, Ranty B: **Calcium/calmodulin-mediated regulation of plant immunity.** *Bba-Mol Cell Res* 2013, **1833**(7):1766-1771.

109. Ali R, Ma W, Lemtiri-Chlieh F, Tsaltas D, Leng Q, von Bodman S, Berkowitz GA: **Death don't have no mercy and neither does calcium: *Arabidopsis* CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL2 and innate immunity.** *Plant Cell* 2007, **19**(3):1081-1095.
110. Gust AA, Biswas R, Lenz HD, Rauhut T, Ranf S, Kemmerling B, Gotz F, Glawischnig E, Lee J, Felix G *et al*: **Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*.** *J Biol Chem* 2007, **282**(44):32338-32348.
111. Laxalt AM, Raho N, ten Have A, Lamattina L: **Nitric Oxide is critical for inducing phosphatidic acid accumulation in xylanase-elicited tomato cells.** *J Biol Chem* 2007, **282**(29):21160-21168.
112. Raho N, Ramirez L, Lanteri ML, Gonorazky G, Lamattina L, Ten Have A, Laxalt AM: **Phosphatidic acid production in chitosan-elicited tomato cells, via both phospholipase D and phospholipase C/diacylglycerol kinase, requires nitric oxide.** *J Plant Physiol* 2011, **168** 534–539.
113. Sun A, Li Z: **Regulatory role of nitric oxide in lipopolysaccharides-triggered plant innate immunity.** *Plant Signal Behav* 2012, **8**(1).
114. Sakihama Y, Murakami S, Yamasaki H: **Involvement of nitric oxide in the mechanism for stomatal opening in *Vicia faba* leaves.** *Biologia Plantarum* 2003, **46**(1):117-119.
115. Sokolovski S, Blatt MR: **Nitric oxide block of outward-rectifying K<sup>+</sup> channels indicates direct control by protein nitrosylation in guard cells.** *Plant Physiol* 2004, **136**(4):4275-4284.
116. Cooney RV, Harwood PJ, Custer LJ, Franke AA: **Light-Mediated Conversion of Nitrogen-Dioxide to Nitric-Oxide by Carotenoids.** *Environ Health Persp* 1994, **102**(5):460-462.
117. Jasid S, Simontacchi M, Bartoli CG, Puntarulo S: **Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins.** *Plant Physiol* 2006, **142**(3):1246-1255.
118. Modolo LV, Augusto O, Almeida IMG, Magalhaes JR, Salgado I: **Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*.** *FEBS Lett* 2005, **579**(17):3814-3820.
119. Shi FM, Li YZ: ***Verticillium dahliae* toxins-induced nitric oxide production in *Arabidopsis* is major dependent on nitrate reductase.** *Bmb Rep* 2008, **41**(1):79-85.
120. Freschi L, Rodrigues MA, Domingues DS, Purgatto E, Van Sluys MA, Magalhaes JR, Kaiser WM, Mercier H: **Nitric Oxide Mediates the Hormonal Control of Crassulacean Acid Metabolism Expression in Young Pineapple Plants.** *Plant Physiol* 2010, **152**(4):1971-1985.
121. Zhao MG, Chen L, Zhang LL, Zhang WH: **Nitric Reductase-Dependent Nitric Oxide Production Is Involved in Cold Acclimation and Freezing Tolerance in *Arabidopsis*.** *Plant Physiol* 2009, **151**(2):755-767.
122. Yamasaki H, Sakihama Y: **Simultaneous production of nitric oxide and peroxyxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species.** *FEBS Lett* 2000, **468**(1):89-92.
123. Wendehenne D, Lamotte O, Frachisse JM, Barbier-Brygoo H, Pugin A: **Nitrate efflux is an essential component of the cryptogin signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco.** *Plant Cell* 2002, **14**(8):1937-1951.
124. Mittler R: **Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance.** *Trends Plant Sci* 2002, **7**(9):405-410.
125. Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F: **Reactive oxygen gene network of plants.** *Trends Plant Sci* 2004, **9**(10):490-498.
126. Scandalios JG: **Oxidative stress and defense mechanisms in plants: introduction.** *Free Radical Bio Med* 1997, **23**(3):471-472.
127. Wang YQ, Lin AH, Loake GJ, Chu CC: **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Leaf Cell Death and the Crosstalk of Reactive Nitric/Oxygen Species.** *J Integr Plant Biol* 2013, **55**(3):202-208.

128. Kim TH, Bohmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI: **Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Abscisic Acid, CO<sub>2</sub>, and Ca<sup>2+</sup> Signaling.** *Annu Rev Plant Biol* 2010, **61**:561-591.
129. Miao YC, Song, C.P., Dong, F.C., Wang, X.C. : **ABA-induced hydrogen peroxide generation in guard cells of *Vicia faba*.** *Acta Phytophysiologica Sinica* 2000, **26**:53–58.
130. Hideg E, Barta C, Kalai T, Vass I, Hideg K, Asada K: **Detection of singlet oxygen and superoxide with fluorescent sensors in leaves under stress by photoinhibition or UV radiation.** *Plant Cell Physiol* 2002, **43**(10):1154-1164.
131. Aro EM, Suorsa M, Rokka A, Allahverdiyeva Y, Paakkarinen V, Saleem A, Battchikova N, Rintamaki E: **Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes.** *J Exp Bot* 2005, **56**(411):347-356.
132. Asada K: **The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons.** *Annu Rev Plant Phys* 1999, **50**:601-639.
133. Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler R, Miller G: **ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress.** *Plant Cell Environ* 2012, **35**(2):259-270.
134. Tripathy BC, Oelmuller R: **Reactive oxygen species generation and signaling in plants.** *Plant Signal Behav* 2012, **7**(12):1621-1633.
135. Zhang X, Zhang L, Dong FC, Gao JF, Galbraith DW, Song CP: **Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*.** *Plant Physiol* 2001, **126**(4):1438-1448.
136. Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, Bloom RE, Bodde S, Jones JDG, Schroeder JI: **NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*.** *Embo J* 2003, **22**(11):2623-2633.
137. Munemasa S, Hossain MA, Nakamura Y, Mori IC, Murata Y: **The *Arabidopsis* Calcium-Dependent Protein Kinase, CPK6, Functions as a Positive Regulator of Methyl Jasmonate Signaling in Guard Cells.** *Plant Physiol* 2011, **155**(1):553-561.
138. Lindermayr C, Saalbach G, Durner J: **Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*.** *Plant Physiol* 2005, **137**(3):921-930.
139. Oger E, Marino D, Guigonis JM, Pauly N, Puppo A: **Sulfenylated proteins in the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis.** *J Proteomics* 2012, **75**(13):4102-4113.
140. Salmeen A, Barford D: **Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases.** *Antioxid Redox Sign* 2005, **7**(5-6):560-577.
141. Fedoroff N: **Redox regulatory mechanisms in cellular stress responses.** *Ann Bot* 2006, **98**(2):289-300.
142. Snyder SH: **Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters.** *Science* 1992, **257**(5069):494-496.
143. Rodrigo J, Springall DR, Uttenthal O, Bentura ML, Abadia-Molina F, Riveros-Moreno V, Martinez-Murillo R, Polak JM, Moncada S: **Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain.** *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 1994, **345**(1312):175-221.
144. Prochazkova D, Wilhelmova N: **Nitric oxide, reactive nitrogen species and associated enzymes during plant senescence.** *Nitric Oxide* 2011, **24**(2):61-65.
145. Tanno M, Sueyoshi S, Miyata N, Nakagawa S: **Nitric oxide generation from aromatic N-nitrosoureas at ambient temperature.** *Chem Pharm Bull* 1996, **44**(10):1849-1852.
146. Ramamurthi A, Lewis RS: **Measurement and modeling of nitric oxide release rates for nitric oxide donors.** *Chem Res Toxicol* 1997, **10**(4):408-413.
147. Wodala B, Deak Z, Vass I, Erdei L, Altorjay I, Horvath F: **In vivo target sites of nitric oxide in photosynthetic electron transport as studied by chlorophyll fluorescence in pea leaves.** *Plant Physiol* 2008, **146**(4):1920-1927.
148. Hill AC, Bennett JH: **Inhibition of apparent photosynthesis by nitrogen oxides.** *Atmospheric Environment* 1970, **4**:341–348.
149. Saxe H: **Stomatal-Dependent and Stomatal-Independent Uptake of Nox.** *New Phytol* 1986, **103**(1):199-205.

150. Jin CW, Du ST, Zhang YS, Tang C, Lin XY: **Atmospheric nitric oxide stimulates plant growth and improves the quality of spinach (*Spinacia oleracea*)**. *Ann Appl Biol* 2009, **155**(1):113-120.
151. Takahashi S, Yamasaki H: **Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide**. *FEBS Lett* 2002, **512**(1-3):145-148.
152. Diner BA, Petrouleas V: **Formation by No of Nitrosyl Adducts of Redox Components of the Photosystem-II Reaction Center .2. Evidence That HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>- CO<sub>2</sub> Binds to the Acceptor-Side Non-Heme Iron**. *Biochim Biophys Acta* 1990, **1015**(1):141-149.
153. Schansker G, Goussias C, Petrouleas V, Rutherford AW: **Reduction of the Mn cluster of the water-oxidizing enzyme by nitric oxide: Formation of an S<sub>2</sub> state**. *Biochemistry-US* 2002, **41**(9):3057-3064.
154. Wodala B, Deák Z, Vass I, Erdei L, Horváth F: **Nitric oxide modifies photosynthetic electron transport in pea leaves**. In: *8th Hungarian Congress on Plant Physiology and the 6th Hungarian Conference on Photosynthesis: 2005; Szeged, Hungary*. Acta Biologica Szegediensis: 7-8.
155. Abat JK, Mattoo AK, Deswal R: **S-nitrosylated proteins of a medicinal CAM plant *Kalanchoe pinnata* - ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity targeted for inhibition**. *Febs J* 2008, **275**(11):2862-2872.
156. Vladkova R, Dobrikova AG, Singh R, Misra AN, Apostolova E: **Photoelectron transport ability of chloroplast thylakoid membranes treated with NO donor SNP: Changes in flash oxygen evolution and chlorophyll fluorescence**. *Nitric Oxide* 2011, **24**(2):84-90.
157. Shepherd R, Reader S, Falshaw A: **Chitosan functional properties**. *Glycoconjugate J* 1997, **14**(4):535-542.
158. Kitajima M, Butler WL: **Quenching of Chlorophyll Fluorescence and Primary Photochemistry in Chloroplasts by Dibromothymoquinone**. *Biochim Biophys Acta* 1975, **376**(1):105-115.
159. Schreiber U, Schliwa U, Bilger W: **Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer**. *Photosynth Res* 1986, **10**(1):51-62.
160. Oxborough K, Baker NR: **Resolving chlorophyll *a* fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components - calculation of *qP* and *F<sub>v</sub>'/F<sub>m</sub>'* without measuring *F<sub>o</sub>'***. *Photosynth Res* 1997, **54**(2):135-142.
161. Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards GE: **New fluorescence parameters for the determination of Q<sub>A</sub> redox state and excitation energy fluxes**. *Photosynth Res* 2004, **79**(2):209-218.
162. Genty B, Briantais JM, Baker NR: **The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence**. *Biochim Biophys Acta* 1989, **990**(1):87-92.
163. Bilger W, Björkman O: **Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis***. *Photosynth Res* 1990, **25**(3):173-185.
164. Snyrychova I, Ayaydin F, Hideg E: **Detecting hydrogen peroxide in leaves in vivo - a comparison of methods**. *Physiol Plantarum* 2009, **135**(1):1-18.
165. Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T: **Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: Diaminofluoresceins**. *Anal Chem* 1998, **70**(13):2446-2453.
166. Koers S, Deger AG, Marten I, Roelfsema MR: **Barley mildew and its elicitor chitosan promote closed stomata by stimulating guard cell S-type anion channels**. *Plant J* 2011.
167. Pei ZM, Kuchitsu K, Ward JM, Schwarz M, Schroeder JI: **Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in *Arabidopsis* wild-type and *abi1* and *abi2* mutants**. *Plant Cell* 1997, **9**(3):409-423.
168. Roelfsema MR, Levchenko V, Hedrich R: **ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels**. *Plant J* 2004, **37**(4):578-588.

169. Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E: **Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors.** *Science* 2009, **324**(5930):1064-1068.
170. Mustilli AC, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J: **Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production.** *Plant Cell* 2002, **14**(12):3089-3099.
171. Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Stange A, Marten I, Bauer H, Ache P, Matschi S, Liese A, Al-Rasheid KA *et al*: **Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(50):21425-21430.
172. MacRobbie EAC: **ABA activates multiple Ca<sup>2+</sup> fluxes in stomatal guard cells, triggering vacuolar K<sup>+</sup>(Rb<sup>+</sup>) release.** *P Natl Acad Sci USA* 2000, **97**(22):12361-12368.
173. Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT: **Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants.** *J Exp Bot* 2002, **53**(372):1237-1247.
174. Suhita D, Raghavendra AS, Kwak JM, Vavasseur A: **Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure.** *Plant Physiol* 2004, **134**(4):1536-1545.
175. Kolla VA, Raghavendra AS: **Nitric oxide is a signaling intermediate during bicarbonate-induced stomatal closure in *Pisum sativum*.** *Physiol Plantarum* 2007, **130**(1):91-98.
176. Kolla VA, Vavasseur A, Raghavendra AS: **Hydrogen peroxide production is an early event during bicarbonate induced stomatal closure in abaxial epidermis of *Arabidopsis*.** *Planta* 2007, **225**(6):1421-1429.
177. Michelet L, Zaffagnini M, Marchand C, Collin V, Decottignies P, Tsan P, Lancelin JM, Trost P, Miginiac-Maslow M, Noctor G *et al*: **Glutathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants.** *P Natl Acad Sci USA* 2005, **102**(45):16478-16483.
178. Goussias C, Deligiannakis Y, Sanakis Y, Ioannidis N, Petrouleas V: **Probing subtle coordination changes in the iron-quinone complex of photosystem II during charge separation, by the use of NO.** *Biochemistry-Us* 2002, **41**(51):15212-15223.
179. Diner BA, Petrouleas V: **Formation by NO of nitrosyl adducts of redox components of the photosystem-II reaction center. 2. Evidence that HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> / CO<sub>2</sub> binds to the acceptor-side non-heme iron.** *Biochim Biophys Acta* 1990, **1015**(1):141-149.
180. Mur LA, Mandon J, Persijn S, Cristescu SM, Moshkov IE, Novikova GV, Hall MA, Harren FJ, Hebelstrup KH, Gupta KJ: **Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge.** *AoB plants* 2013, **5**:pls052.
181. Talbott LD, Zeiger E: **Sugar and organic acid accumulation in guard cells of *Vicia faba* in response to red and blue light.** *Plant Physiol* 1993, **102**(4):1163-1169.
182. Vavasseur A, Raghavendra AS: **Guard cell metabolism and CO<sub>2</sub> sensing.** *New Phytol* 2005, **165**(3):665-682.
183. Hu HH, Boisson-Dernier A, Israelsson-Nordstrom M, Bohmer M, Xue SW, Ries A, Godoski J, Kuhn JM, Schroeder JI: **Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO<sub>2</sub>-controlled stomatal movements in guard cells.** *Nat Cell Biol* 2010, **12**(1):87-U234.
184. Yang JD, Zhao HL, Zhang TH, Yun JF: **Effects of exogenous nitric oxide on photochemical activity of photosystem II in potato leaf tissue under non-stress condition.** *Acta Bot Sin* 2004, **46**(9):1009-1014.
185. Millar AH, Day DA: **Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria.** *FEBS Lett* 1996, **398**(2-3):155-158.
186. Abat JK, Deswal R: **Differential modulation of S-nitrosoproteome of *Brassica juncea* by low temperature: Change in S-nitrosylation of Rubisco is responsible for the inactivation of its carboxylase activity.** *Proteomics* 2009, **9**(18):4368-4380.

## 8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először is hálásan köszönöm témavezetőm, Dr. Horváth Ferenc egyetemi adjunktus minden segítségét, aki mindvégig önzetlenül és fáradhatatlanul segítette a munkám a TDK dolgozatom, diplomamunkám és e doktori értekezés elkészítésében is. Köszönöm neki azt az iránymutatást, ami a mindennapi életem jelenlegi alakulásához vezetett, és hogy szakmailag és barátilag egyaránt végig mellettem állt.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Erdei László egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette, hogy az SZTE Növényélettani Tanszékén készítsem el a diplomamunkám, valamint, hogy a Növénybiológiai Tanszéken kezdhettem meg doktori tanulmányaimat.

Köszönettel tartozom Dr. Görgényi Miklósné Dr. Tari Irmának, az SZTE Növénybiológiai Tanszék tanszékvezető egyetemi docensének, amiért munkám során oly sok támogatást és lehetőséget biztosított számomra.

Köszönettel tartozom továbbá kicsi, de annál erősebb munkacsoportunk harmadik tagjának, Dr. Wodala Barnabás egyetemi adjunktusnak is, akire, bármilyen problémám adódott is, mindig számíthattam.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani a Növénybiológiai Tanszék összes volt és jelenlegi munkatársának, PhD hallgatójának és szakdolgozójának, akik nélkül e dolgozat nem készülhetett volna el.

Szeretnék köszönetet mondani feleségemnek, Ördögné Dr. Kolbert Zsuzsannának, és kisfiamnak, Bencének, akik mindvégig támogattak, és mellettem álltak, akkor is, ha pontosan tudták, hogy ez milyen lemondásokkal jár. Köszönettel tartozom továbbá szüleimnek és testvéremnek, akik elindítottak és erejükön felüli támogatást biztosítottak számomra már a tudományos pályafutásom kezdetétől.

Végezetül pedig szeretném megköszönni az OTKA 81471 és a Magyarország-Románia Határon Átnyúló Együttműködési Program keretében történő pályázatok számára a kutatásaim infrastrukturális háttérének megteremtését. A kutatásaim a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program című kiemelt projekt által nyújtott személyi támogatással valósultak meg. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

**DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI****A GOMBA EREDETŰ ELICITOR KITOZÁN HATÁSA A  
ZÁRÓSEJTEK MŰKÖDÉSÉRE:  
A SZTÓMAMOZGÁS ÉS A ZÁRÓSEJT FOTOSZINTÉZISÉNEK  
KAPCSOLATA****Ördög Attila**

Témavezető: Dr. Horváth Ferenc

*egyetemi adjunktus*

Növénybiológiai Tanszék

Természettudományi és Informatikai Kar

Szegedi Tudományegyetem

**BEVEZETÉS**

A zárósejtek, a növényi epidermisz olyan speciális tulajdonságú sejtjei, melyek turgoruk változtatásával a gázcserét, a párologtatást és a levelek hőmérsékletét egyaránt meghatározzák. A zárósejtek amellet, hogy a párologtatáson keresztül segítik a levelek hőmérsékletének szabályozását, néhány mikrométeres szenzorként is működnek. Egyaránt képesek a belső hormonális és a külső környezeti jelek érzékelésére. Mindemellet, rendkívül fontos szerepük van a patogének elleni harcban is. A növényi sejtfa emésztésére képtelen patogének a nyitott sztómákon, mint természetes nyílásokon keresztül bejutva akár az egész növény megfertőzésére képesek. A sztómáknak így, mint a növényi immunrendszer első bástyáinak fontos szerepük van a különböző mikroorganizmusok felismerésében, és a megfelelő védekezési válaszok elindításában. A zárósejtek képesek az egyes mikroorganizmusokhoz kapcsolható molekuláris mintázatok (MAMP) felismerésére, mint például a kitozán, gomba sejtfa származék felismerésére is. Az érzékelést követően a kitozán hatására gátlódik a fény indukálta sztómanyitódás, továbbá a sztómazáródásban

szereplő különböző jelátviteli komponensek és transzporterek is aktiválódnak. A sztómazáródás és nyitódás során egyaránt szerepet játszik a plazmamembránban található  $H^+$ -ATPáz, mely ATP energiáját felhasználva protonokat juttat az extracelluláris térbe, növelve a membrán két oldala között fennálló, protonokra vonatkozó elektrokémiai potenciálkülönbséget. A  $H^+$ -ATPáz energiáját elsősorban a mitokondriumok biztosítják, azonban mivel a fotoszintézis gátló DCMU használata csökkent nyitottságot eredményez, így arra lehet következtetni, hogy a nyitódás során a felhasznált energia egy része (nagyjából 35%) a zárósejtekben található kloroplasztiszokból származtatható. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a kitozán lehetséges fotoszintézis-gátló hatását, nyomon követtük a nap folyamán a kitozán-kezelt növények zárósejtjeinek fotoszintetikus aktivitását Mycroscopy-PAM fluoriméter (Walz GmbH, Németország) segítségével. Mivel a kitozán molekulaszervezetéből adódóan nem juthat be a sejtekbe, így a jelátvitel során bizonyítottan felhalmozódó anyagok ( $H_2O_2$  és NO) fotoszintézisre gyakorolt hatását is megvizsgáltuk.

## CÉLKITŰZÉSEK

Munkánkban az egyik legáltalánosabb gomba MAMP, a kitozán sztómaműködésre gyakorolt hatását vizsgáltuk lóbab (*Vicia faba* L.) modellnövényben. A kitozán a sejtmembrán számára átjárhatatlan, hatását így feltehetően csak a sejt felszíni receptorokon keresztül képes kifejteni. Receptorával való kapcsolódása különböző jelátviteli utakat indukálhat, ezért célunk a lehetséges jelátvivő molekulák azonosítása, és azok lehetséges fotoszintézisre gyakorolt hatásának részletes vizsgálata volt.

Az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Vajon a *Vicia faba* zárósejtjei képesek-e a kitozán molekulát, mint MAMP vegyületet felismerni, és hatására bekövetkezik-e sztómazáródás illetve sztómanyitódás-gátlás? Amennyiben igen, akkor vajon a  $H_2O_2$  és NO, mint jelátvivő komponens szerepel-e a kitozán-indukált jelátviteli utak hálózatában? E jelátvivő molekulák mely kompartmentumokban és a kitozán kezelés után mennyi idővel keletkeznek?
2. A zárósejtek környezetében lévő parenchima réteg mezofillum sejtjei vajon befolyásolják-e a kitozán sztómaműködésre gyakorolt hatását?



3. Vajon a kitozán befolyásolja-e a zárósejtek fotoszintetikus aktivitását, ezáltal csökkentve vagy növelve a záródáshoz és nyitódáshoz szükséges ATP és NADPH mennyiségét?
4. Tilakoid membránok és intakt levelek esetében már igazolták, hogy a NO gátolja a PSII donor és akceptor oldali elektronátadódási folyamatait. Amennyiben sikeresen azonosítani tudnánk a kitozán indukálta  $H_2O_2$  és NO megjelenését, exogén  $H_2O_2$  és NO-donorok használatával tesztelni szeretnénk ezek fotoszintetikus elektrontranszportláncra gyakorolt hatását zárósejtekben.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

- Kísérleti növény: Lóbab (*Vicia faba L.*)
- Nevelési körülmények: a növényeket 4 hetes korukig hidropónikusan neveltük módosított Hoagland tápoldatban (2 mM  $Ca(NO_3)_2$ , 1 mM  $MgSO_4$ , 0,5 mM KCl, 0,5 mM  $KH_2PO_4$ , 0,5 mM  $Na_2HPO_4$ , 0,001 mM  $MnSO_4$ , 0,005 mM  $ZnSO_4$ , 0,0001 mM  $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ , 0,01 mM  $H_3BO_4$ , and 0,02 mM Fe(III)-EDTA, pH 6,0).
- Kísérleti oldatok:
  - Inkubációs oldat : 10 mM MES, 10 mM KCl, 100  $\mu M$   $CaCl_2$  (pH 6,15 TRIS)
  - 100  $\mu g\ ml^{-1}$  alacsony molekula tömegű (LMW) kitozán oldat 1 mM Na-acetát tartalmú inkubációs oldatban oldva
  - S-nitroso-glutation (GSNO), mint NO donor
  - 100  $\mu M$   $H_2O_2$
- A keletkezett NO mennyiségét NO-elektrod segítségével amperometriás módon határoztuk meg (ISO-NOP; World Precision Instruments Inc., USA).
- Kezelési időpontok: hajnali kísérletek során 5:30-kor (a sztómanyitódás gátlásának vizsgálata), míg a napközbeni kísérletek esetében 10:00-kor (a sztómazáródás indukciójának és a sztómanyitódás gátlásának vizsgálat) inkubációs oldattal, kontrollként és 100  $\mu g\ ml^{-1}$  kitozán tartalmú oldattal.
- Sztóma pórusátmérő meghatározása: frissen készített epidermisz nyúzatokon történt, ezekről mikroszkópos (Nikon Eclipse TS-100, Japán) felvételt készítettünk,

melyeket az ImagePro 5 program (Media Cybernetics, USA) segítségével elemeztünk ki. Minden kezelés esetében legalább 90 db sztómát vizsgáltunk meg.

- Epidermisz nyúzatok előkészítése a zárósejteken végzett Microscopy-PAM mérésekhez: a mérések előtt 5 perces kezelés történt a hipoozmotikus inkubációs oldatban, a mezofillum sejtek, vagy a nyúzás során keletkezett mezofillum törmelék eltávolítására.
- A klorofill *a* fluoreszcencia mérések Microscopy-PAM fluoriméter (Walz GmbH, Németország) segítségével történtek, melyek során gyors fényválasz görbéket vizsgáltunk meg.
- A fluoreszcencia indukció és kioltási analízis során a következő paramétereket vizsgáltuk meg (a gyors fényválasz görbék alapján):
  - A sötétadaptált PSII reakciócentrumok (RC) maximális kvantumhatásfokát ( $F_v/F_m$ )
  - A fotokémiai kioltási együtthatókat ( $qP$  és  $qL$ ), melyek a nyitott PSII reakciócentrumok részarányát becsülik nem-kapcsolt ( $qP$ ) és kapcsolt ( $qL$ ) reakciócentrumok esetén
  - A PSII reakciócentrumok effektív kvantumhatásfokát ( $\Phi_{PSII}$ )
  - A fényadaptált PSII reakciócentrumok maximális fotokémiai kvantumhatásfokát az  $F_v'/F_m'$  paraméterrel becsültük
  - A PSII rendszeren keresztüli lineáris elektrontranszport sebességét (ETR)
  - A nem-fotokémiai kioltást a Stern-Volmer típusú nem-fotokémiai kioltással (NPQ) becsültük
- A  $H_2O_2$  (AmplexRed, 1mM) és a NO (DAF-FM, 10  $\mu$ M) kvalitatív vizsgálata fluoreszcens jelölők segítségével konfokális lézer pásztázó mikroszkóp használatával történt.
- Statisztikai analízis: Student-féle t-próba segítségével (OriginPro 8.6, OriginLab Corporation, USA).

## EREDMÉNYEK

A kitozán, a  $\beta$ -1,4-glükózamin láncokból felépülő gomba sejtfalalkotó molekula kék fény-indukált sztómányitódás-gátló, és sztómazáródást serkentő hatását több növényfaj esetében bizonyították. A sztómányitódáshoz és záródáshoz vezető jelátviteli útvonalak és az ionáramlást irányító transzporterek szerteágazó hálózatát a kitozán több ponton

---

befolyásolhatja. Kísérleteink során e hatás igazolását tűztük ki célul *Vicia faba L.* modellnövény esetén.

1. Elsőként igazoltuk, hogy *Vicia faba* esetében a levelek kitozánnal történő permetezése nem indukált sztómazáródást, azonban a sztómanyitódást meggátolta. Mivel ezen eredmények az irodalomból ismert korábbi eredményeknek csak részben feleltethetők meg, így további kísérletek során a kitozán hatására aktiválódó jelátviteli komponensek megjelenését is megvizsgáltuk. Specifikus fluoreszcens jelölők segítségével szintén elsőként igazoltuk, hogy a  $H_2O_2$  és a NO, mint jelátvivő molekulák a *Vicia faba* zárósejtek kloroplasztiszaiban a kitozán-kezelést követő 1 órán belül felhalmozódtak. Szintén elsőként térünk ki arra, hogy érdekes módon a  $H_2O_2$  felhalmozódás feltehetően elsősorban a kloroplasztiszok sztrómájában és a sejtmagokban volt megfigyelhető, míg a NO a kloroplasztiszokon kívül a citoplazmában és pórus körüli sejtfalakban is megjelent.
2. Abaxiális epidermisz nyúzatok alkalmazásával hasonló eredményeket kaptunk, melyek segítségével ki tudtuk zárni a mezofillum sejtek kitozán indukált sztómamozgásokban betöltött szerepét.
3. Mivel a sztómák nyitódásában és a nyitott állapot fenntartásában a fotoszintetikus eredetű ATP és NADPH fontos szerepet tölt be, ezért a kitozán zárósejtek fotoszintetikus aktivitására gyakorolt hatását is megvizsgáltuk. Az abaxiális epidermiszben található zárósejtek fotoszintetikus aktivitását PAM klorofill fluorimetriás módszerrel tanulmányoztuk. Kísérleteink során új eredményként azt tapasztaltuk, hogy a hajnalban kezelt növények zárósejtjeiben jelentősen lecsökkent a PSII rendszeren keresztüli ETR értéke, ami a kontroll növényekhez képest a nap hátralevő részében is alacsony maradt. A fotokémiai kioltási együtthatók ( $qP$  és  $qL$ ), a  $\Phi_{PSII}$  és az NPQ más és más kinetikát mutatva ugyan, de szintén teljesen lecsökkentek. Érdekes módon a napközbeni kitozán-kezelések során egyik paraméter esetében sem tapasztaltunk hasonló változást.
4. Mivel a kitozán zárósejtek fotoszintézisére gyakorolt hatását feltehetően a sejtfelszíni receptorok által indukált jelátviteli utak révén fejtheti ki, megvizsgáltuk a már korábban igazolt jelátviteli komponensek ( $H_2O_2$  és NO) esetleges fotoszintézisre gyakorolt hatását is. Míg a  $H_2O_2$  esetében nem tapasztaltuk a kitozán-kezelésre jellemző változásokat, a nagy koncentrációban külsőleg alkalmazott NO esetében a kitozán-kezeléshez nagyon hasonló gátlást figyeltünk

meg az ETR, a  $qP$ ,  $qL$ , a  $\Phi_{PSII}$ , és az NPQ paraméterek esetében is. Az irodalomban először igazoltuk, hogy a NO-kezelés hatása reverzibilisnek mutatkozik, ugyanis a NO sejtek környezetéből történő gyors eltávolítása révén az egyes fluoreszcencia paraméterek a kiindulási értékeikre tértek vissza. A NO lineáris elektrontranszportláncot gátló hatása megfelelően nagy koncentrációjú bikarbonáttal feloldhatónak bizonyult. Az eredmény arra utal, hogy gátlást túlnyomó részben az okozza, hogy a NO a vele a kötőhelyért versengő bikarbonátot a  $Q_A$  és  $Q_B$  közti nem-hem  $Fe^{2+}$ -ról leszorítja.

Fontos azonban azt is megjegyezni, hogy a kitozán hatására történő sztómazáródás következtében a levelek belsejében a  $CO_2$  koncentrációja lecsökkenhet, így a kitozán a Calvin-Benson ciklus lassításával is hozzájárulhat a zárósejtek fotoszintetikus aktivitásának csökkenéséhez.

A kapott eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a kitozán feltehetőleg a NO bioszintézisének aktiválásán keresztül a zárósejtek fotoszintézisét gátolja, ezáltal a fotoszintetikus eredetű ATP és a NADPH mennyiségét csökkenti, mely a sztómanyitódás elmaradásához és a sztómazáródás folyamatának elősegítéséhez egyaránt hozzájárulhat.

**SUMMARY OF THE THESIS****THE EFFECT OF THE FUNGAL ELICITOR CHITOSAN ON GUARD CELL FUNCTION: THE CONNECTION BETWEEN STOMATAL MOVEMENT AND THE PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY OF GUARD CELLS****Attila Ördög**

Supervisor: Dr. Ferenc Horváth

University of Szeged

Faculty of Science and Informatics

Department of Plant Biology

**INTRODUCTION**

Stomata control gas exchange and transpirational water loss by turgor-driven volume changes, but they also provide the main entrance for pathogens. Guard cells (GC) respond to the presence of microbes by narrowing stomatal pores following perception of microorganism-associated molecular patterns (MAMPs), such as chitosan, a deacetylated derivative of a major fungal cell wall component chitin. Besides the inhibition of the light-induced stomatal opening chitosan also induces stomatal closure, an action with distinct signalling pathways and transporters. Stomatal opening and closure is related to the H<sup>+</sup>-ATPase activity in the GC plasma membrane, as this activity affects the transport of osmotically active solutes, such as the passive movement of K<sup>+</sup> via different sets of potassium channels, the activity of Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> symporters and anion channels. ATP for proton pumping is supplied mostly from mitochondrial respiration; however, partial inhibition by DCMU implied a role of GC photosynthetic electron transport in the ATP supply. In order to ascertain whether chitosan affects GC photosynthetic ATP production, the light-dependence of the photosynthetic electron transport rate of a single GC was assayed. *Vicia*

*faba* epidermal peels were bathed in solutions containing different molecular weight chitosan and chlorophyll fluorescence parameters were determined by a Microscopy-PAM chlorophyll fluorometer (Walz, Germany). A possible role of hydrogen peroxide and nitric oxide molecules in chitosan signalization, as well as photosynthetic ATP production, was also investigated.

## AIMS OF THE STUDY

The purpose of this work is to examine the effect of chitosan, the most common fungal elicitor affecting the function of guard cells. Since chitosan is impermeable to cell membranes, its effect can be elucidated only by the signal compounds of the activated intracellular signalling pathways. So our additional goal was to investigate the potential effect of certain members in this pathway.

The particular goals of this work are summarized by the following points:

1. Are *Vicia faba* guard cells able to recognize the chitosan molecule as MAMP? If so, does chitosan cause stomatal closure or inhibit the stomatal opening? If chitosan can influence the stomatal movements, will it raise the level of hydrogen peroxide or nitric oxide, the two major compounds of the chitosan-induced signalling cascade? We were also curious about in what compartment and how long after the chitosan treatment do these compounds accumulate?
2. Do mesophyll cells surrounding the guard cells influence the effect of chitosan on stomatal movements?
3. Does chitosan affect the photosynthetic activity of guard cells, thereby influencing the amount of the required NADPH and ATP for stomatal closing and opening?
4. EPR measurements on thylakoid membrane complexes have shown that NO inhibits electron transfer processes in PSII and target sites have also been identified, such as the nonheme iron between the Q<sub>A</sub> and Q<sub>B</sub> binding sites. If we can detect chitosan-induced hydrogen peroxide and nitric oxide, we aim to investigate the effect of both molecules on the photosynthetic activity of guard cells, using external donor chemicals.

---

## MATERIALS AND METHODS

**Plant material:** Leaves of hydroponically grown four-week-old broad bean (*Vicia faba L.*) plants.

**Treatment:** Prior to measurements, leaves were sprayed with experimental solutions containing 1 mM  $C_2H_3NaO_2$ , 10 mM MES, 10 mM KCl and 100  $\mu$ M  $CaCl_2$  (pH 6.15 with KOH) with 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> chitosan (CHT solution) or without chitosan (control solution). Leaves were treated at 5:30 AM (inhibition of stomatal opening) or at 10:00 AM (induction of stomatal closure).

S-nitroso-gluthatione (GSNO) was used as NO donor molecule. The concentration of NO was measured apermometrically using a NO electrode (ISO-NOP, WPI, USA).

**Stomatal aperture measurements:** The width of stomatal apertures was measured on pictures taken from freshly peeled epidermal strips with the Image-Pro Plus 5.1 image analyser software. The experiments were repeated on three different days, each yielding the average of at least 90 aperture widths.

**Epidermal strip bioassay:** Prior to each experiment, the abaxial epidermis was peeled carefully from the third to fourth completely unfolded leaves and submerged in the experimental solution. The strips contained only small regions contaminated with mesophyll cells – mainly around the major veins – and these regions were excised with a razor blade. The strips were transferred and washed for 5 minutes in the hypoosmotic experimental solution in order to remove any remaining mesophyll cell debris and mesophyll chloroplasts by severe osmotic shock.

**Chlorophyll *a* fluorescence measurements:** Chlorophyll *a* fluorescence of 4 to 5 stomata from a mesophyll-free abaxial epidermis patch was monitored with a MYCROSCOPY-PAM chlorophyll fluorometer (Walz GmbH, Germany) mounted on an inverted epifluorescence microscope (Zeiss Axiovert 40, Zeiss GmbH, Germany). During rapid light curves the following photosynthetic parameters were obtained:

- Maximal quantum efficiency ( $F_v/F_m$ )
- The PSII efficiency factors ( $qP$  and  $qL$ )
- The effective quantum efficiency of PSII ( $\Phi_{PSII}$ )
- The maximal quantum efficiency of the light-adapted PS II photochemistry ( $F_v'/F_m'$ )
- The apparent relative linear electron transport rate (ETR)
- The Stern-Volmer type non-photochemical quenching (NPQ)

**Localization of the fluorescent probes using confocal microscopy:** Localization of the fluorescent probes (AmplexRed – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; DAF-FM DA – NO) in the abaxial epidermis of intact leaves were carried out using confocal laser scanning microscopy (Olympus FV1000 LSM, Olympus Life Science Europa GmbH, Hamburg, Germany).

**Statistical analysis:** Results are expressed as mean ± SD. In indicated cases, Student's t-test was used (\*P ≤ 0.05, \*\*P ≤ 0.01, \*\*\*P ≤ 0.001).

## RESULTS

It has been shown in many types of plants that chitosan not only inhibits light-induced stomatal opening but can also induce stomatal closure, an action with distinct signalling pathways and transporters. Our goals were to prove the effect of chitosan on *Vicia faba* guard cells. Our results can be summarized in the following points.

1. As a new result we confirmed that, in *Vicia faba*, chitosan does not induce stomatal closure but it does inhibit stomatal opening. Using specific fluorescent probes we have shown that chitosan enhances the level of hydrogen peroxide and nitric oxide already after one hour of treatment. Hydrogen peroxide accumulates mainly in the chloroplasts (probably in the stroma) and in the nuclei, while the level of nitric oxide increases in chloroplasts, in the cytoplasm and in cell walls around the stomatal pores.
2. Using abaxial epidermal peels we show that mesophyll cells do not play an exclusive role in chitosan induced stomatal movements.
3. Since stomatal opening and maintaining of the open state are energy dependent processes, the effect of chitosan on photosynthetic activity of guard cells has been investigated. As a new result we show that guard cells on leaves treated at dawn showed decreased ETR values, which remained low compared to the control during the whole day. The values of  $qP$ ,  $qL$ ,  $\Phi_{PSII}$  and NPQ remained also very low. Interestingly, our results also indicate that treatment at 10:00 AM does not influence the photosynthetic activity of guard cells.
4. Since chitosan can act only through cell surface receptors, two compounds from the intracellular signalling pathway have been further investigated: we examined the effect of exogenously applied H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100µM) and NO (450 nM) on the photosynthetic activity of guard cells. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was not able to mimic the effect of chitosan. NO, on the other hand, was able to slow down the



photosynthetic activity of guard cells in a similar way as chitosan: the NO treatment decreased the values of ETR, qP, qL,  $\Phi_{PSII}$  and NPQ, which closely resembles the results of the chitosan treatment. The effect of NO has been shown to be reversible, using a high amount of bicarbonate. These results suggest that NO might act on the nonheme iron between the Q<sub>A</sub> and Q<sub>B</sub> binding sites.

It is also very important to note, that chitosan can also induce stomatal closure, which in turn can decrease the amount of CO<sub>2</sub> inside the leaves. This may slow down the activity of the Calvin-Benson cycle, which also influences the linear electron transport processes.

In summary, data in this work provide a confirmation of the effect of chitosan on guard cells of *Vicia faba*. Chitosan, possibly through increasing the amount of NO inside the chloroplasts, can block the photosynthetic activity of guard cells leading to a decreased amount of ATP and NADPH, which may contribute to the induction of stomatal closure and to the inhibition of the stomatal opening.

## PUBLIKÁCIÓS LISTA

## Tudományos dolgozatok:

1. **Ördög A**, Wodala B, Horváth F  
Investigating the role of potassium channel KAT1 in NO mediated stomatal closure  
ACTA BIOLOGICA SZEGEDIENSIS 52:(1) pp. 163-165. (2008)
2. \*Wodala B, **Ördög A**, Horváth F  
The cost and risk of using sodium nitroprusside as a NO donor in chlorophyll fluorescence experiments  
JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY 167:(13) pp. 1109-1111. (2010)  
IF: 2.677
3. \***Ördög A**, Wodala B, Hideg É, Ayaydin F, Deák Z, Horváth F  
Chitosan elicited immune response reduces photosynthetic electron transport and ion channel activity in the guard cells of Vicia  
ACTA BIOLOGICA SZEGEDIENSIS 55:(1) pp. 135-138. (2011)
4. Lehotai N, Kolbert Zs, Pető A, Feigl G, **Ördög A**, Kumar D, Tari I, Erdei L  
Selenite-Induced Hormonal and Signalling Mechanisms during Root Growth of *Arabidopsis thaliana* L.  
JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY 63:(15) pp. 5677-5687. (2012)  
IF: 5,364
5. Wodala B, Eitel G, Gyula TN, **Ördög A**, Horváth F  
Monitoring moderate Cu and Cd toxicity by chlorophyll fluorescence and P<sub>700</sub> absorbance in pea leaves  
PHOTOSYNTHETICA 50 (3): 380-386, 2012  
IF: 1,00
6. \***Ördög A**, Wodala B, Rózsavölgyi T, Tari I, Horváth F  
Regulation of guard cell photosynthetic electron transport by nitric oxide  
JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY 64 (5), pp. 1357-1366 (2013)  
IF: 5.242
7. Feigl G , Kumar D, Lehotai N, Tugyi N, Molnár T, **Ördög A** , Szepesi T, Gémes K, Laskay G, Erdei L, Kolbert Z  
Physiological and morphological responses of the root system of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.) and rapeseed (*Brassica napus* L.) to copper stress  
ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY 94: pp. 179-189. (2013)  
IF: 2,203
8. Peto A, Lehotai N, Feigl G, Tugyi N, **Ördög A**, Gémes K, Tari I, Erdei L, Kolbert Z  
Nitric oxide contributes to copper tolerance by influencing ROS metabolism in *Arabidopsis*  
PLANT CELL REPORTS 32:(12) pp. 1913-1923. (2013)  
IF: 2,509

**Konferencia előadások, poszterek:**

1. **Ördög A**, Wodala B, Horváth F  
Investigating the role of potassium channel KAT1 in NO mediated stomatal closure  
A Magyar Növénybiológiai Társaság IX. Kongresszusa (2008)
2. Kolbert Zs, Vashegyi Á, **Ördög A**, Lehotai N, Méri Á, Erdei L  
Short-time effect of copper ion (Cu<sup>2+</sup>) in nitric oxide (NO) production in *Sorghum sudanense* L. roots  
Uptake, Sequestration and Detoxification. An integrated approach. COST Action 859 Workshop. Szeged, Magyarország, 2009.04.16-2009.04.17. p. 58
3. Horváth F, **Ördög A**, Rózsavölgyi T, Wodala B  
Nitric oxide modulates guard cell photosynthesisI  
3rd Plant NO Club International Meeting. Olomouc, Csehország, 2010.07.14-2010.07.17., Palacký University, p. 16.
4. Horváth F, **Ördög A**, Rózsavölgyi T, Wodala B  
Nitric oxide modulates guard cell photosynthesis  
11 th Inetrnational Symposium Interdisciplinary Regional Research: ISIRR 2010  
Szeged, Magyarország, 2010.10.13-2010.10.15.
5. **Ördög A**, Rózsavölgyi T, Wodala B, Hideg É, Deák Z, Ferhan A, Tari I, Horváth F  
Effect of chitosan on guard cell photosynthesis: XVIII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB)  
XVIII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB).  
Valencia, Spanyolország, 2010.07.04-2010.07.09. p. 186.
6. **Ördög A**, Wodala B, Hideg É, Ayaydin F, Deák Zs, Horváth F  
Chitosan affects guard cell photosynthesis and membrane transport  
10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants.  
Budapest, Magyarország, 2011.07.05-2011.07.08. p.122
7. **Ördög A**, Wodala B, Hideg É, Ayaydin F, Deák Zs, Horváth F  
Chitosan affects guard cell photosynthesis and membrane transport  
XXIV Scandinavian Plant Physiology Congress. Stavanger, Norvégia, 2011.08.21-2011.08.25. pp. 87-88
8. **Ördög A**, Wodala B, Hideg É, Ayaydin F, Deák Zs, Horváth F  
Chitosan elicited immune response reduces photosynthetic electron transport and ion channel activity in the guard cells of *Vicia*  
A Magyar Növénybiológiai Társaság X. Kongresszusa, 2011. augusztus 31.-szeptember 2., Szeged, Magyarország p. 9.
9. Wodala B, **Ördög A**, Ayaydin F, Bernula P, Horváth F  
Investigating pathogen elicitor-induced stomatal responses in various plant species.  
11TH CROATIAN BIOLOGICAL CONGRESS. Sibenik, Horvátország,  
2012.09.16-2012.09.21. p. 177.
10. Feigl G, Kumar D, Pető A, Lehotai N, **Ördög A**, Molnár Á, Kolbert Zs, Erdei L  
The effect of zinc on the microelement homeostasis and the metabolism of reactive signal molecules in *Brassica juncea* and *Brassica napus*.

- COST Action FA 0905 - Mineral improved crop production for healthy food and feed: Third Annual Workshop. Lisszabon, Portugália, 2012.10.23-2012.10.26. p. 32.
11. Lehotai N, L Lyubenova, N Drews, **Ördög A**, Feigl G, Kolbert Zs, Erdei L, P Schröder  
The possibilities and enzymatic background of Se and Zn biofortification of pea plants.  
COST Action FA 0905 - Mineral improved crop production for healthy food and feed: Third Annual Workshop. Lisszabon, Portugália, 2012.10.23-2012.10.26. p. 28.
12. **Ördög A**, Wodala B, Tari L, Horváth F.  
A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és a NO szerepe a bikarbonát indukálta sztómazáródásban *Arabidopsis thaliana* Col-0 és gpa 1-3 növényekben. A MAGYAR SZABADGYÖK-KUTATÓ TÁRSASÁG VII. KONFERENCIÁJA, Debrecen, 2013. augusztus 29-31.
13. **Ördög A**, Csiszár J, Gallé Á, Kolbert Zs, Pécsváradi A, Poór P, Székely Á, Szepesi Á, Wodala B, Tari I.  
Dél-Alföldi eredetű élelmiszerek makro- és mikroelem tartalmának összehasonlítása.  
A MAGYAR SZABADGYÖK-KUTATÓ TÁRSASÁG VII. KONFERENCIÁJA, Debrecen, 2013. augusztus 29-31.
14. **Ördög A**, Csiszár J, Erdei L, Gallé Á, Kolbert Zs, Pécsváradi A, Poór P, Székely Á, Szepesi Á, Wodala B, Tari I  
Characterization of Hungarian honeys from Csongrád County in terms of mineral content  
Food Science Conference 2013 – With research for the success of Darányi Program, Budapest, 2013.11.7-8.