

# **A sztómaműködés szabályozása a növényi immunválasz során**

## ***Bevezetés, a pályázat célja***

A zárósejtek néhány mikrométeres szenzorként működve a belső hormonális és a külső környezeti jelek érzékelésére egyaránt képesek. Mindamellet, hogy turgoruk alapján a sztómapórus méretét, így a növény vízállapotát és a fotoszintetikus aktivitását is meghatározzák, 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-ok között igen változatos eredetű és felépítésű molekulákat vagy molekula darabokat találhatunk, ilyenek például a gomba sejtfa eredetű kitin és kitozán, a bakteriális flagellin molekula 22 aminosavas építője, 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.

Kutatócsoportunk ezen MAMP-ok hatásának vizsgálatát, az érzékelés utáni jelátvitel lépéseit, a zárósejt önálló fotoszintetikus aktivitásának és membrántranszport folyamatainak alakulását kívánta feltérképezni néhány modellnövény esetében.

Azt a nagy mennyiségű adatot, melyet fénymikroszkópos és konfokális lézer pásztázó mikroszkópos mérésekkel, továbbá az egyetlen zárósejt fluoreszcencia hozamát regisztráló Microscopy PAM, és a sejtek membrántranszportját mérő patch clamp módszerrel gyűjtöttünk jelen összefoglalóban nincs lehetőség bemutatni, ezért csak néhány összefoglaló mondattal hivatkozunk ezen eredményekre.

Kiválasztottunk azonban egy MAMP vegyületet, a kitozánt, melynek zárósejtekre gyakorolt hatását ezt követően részletesen elemezzük. Ezen eredményeket a következő hónapokban tudományos folyóiratban való közlésre előkészítettük.

## ***A megvalósulás számszerűsíthető eredményei, személyi változások***

A pályázat 4 éve alatt 11 db közlemény született, ebből 4 db nemzetközi lapban publikált folyóiratcikk 8,801 összesített impakt faktor értékben. A kutatásainkat 7 konferencián mutattuk be, melyből 4 nemzetközi találkozó volt, közülük pedig 1 ahol a pályázat vezetője meghívott előadóként ismertette az eredményeket.

A kitozánnal és a NO zárósejt fotoszintézisére gyakorolt hatásával kapcsolatos kutatások képezték az alapját a pályázat egyik résztvevője, Ördög Attila PhD hallgató doktori dolgozatának, melynek hivatalos védésére 2014 áprilisában kerül sor.

A pályázatban beruházásként tervezett növénynevelő klímakarát és egy teljes Arabidopsis növény víz és gázcseréjét mérni képes LICOR feltétet számítógépekkel együtt beszereztük. Mindezek nélkül az egységes sztómaműködést biztosító nevelési körülmények és az apró levélméretű Arabidopsis mutánsok transzspirációjának mérése nem lett volna megvalósítható.

A pályázat megvalósítása során személyi változások is történtek: 2012 év elején Dr. Hideg Éva (MTA SZBK Növénybiológiai Intézet) távozott a kutatócsoportból, mert ekkortól a Pécsi Tudományegyetem Növényélettani Tanszékén egyetemi tanárként helyezkedett el. A pályázatban tervezett azévi feladatok emiatt a következő évre tolódtak. Dr. Hideg Éva évente tervezett 0,15 FTE értékét és munkáját a pályázatban résztvevő munkatársak, Dr. Deák Zsuzsanna (0,1) és Dr. Ferhan Ayaydin (0,05) végezték el.

## ***Eredmények***

### ***MAMP és DAMP elicitorok sztómaműködésre gyakorolt hatása többféle modellnövény esetén***

#### **ROS és NO kimutatása**

A pályázat első évében a sztómányitottság és a porométeres méréseken túl a jelátvitelben résztvevő ROS és NO molekulák zárósejtekben való kimutatásával foglalkoztunk.

A ROS mérés elengedhetetlen feltétele, hogy a jelző vegyület annak keletkezési helyén megjelenjen, így először azt vizsgáltuk meg, behatolnak-e a használni tervezett jelzők dohány, *Vicia faba* ill. *Arabidopsis* levelek zárósejtjeibe. Erre kiválóan alkalmasak a ROS nélkül erősen fluoreszkáló (azt részleges kioltással jelző) vegyületek, mint a DanePy és annak oxalát sója és a HO-4335, így ezek vizes oldatait közvetlenül használtuk. A ROS nélkül alacsony fluoreszcenciát mutató vegyületeket előzetesen oxidáltuk, a Singlet Oxygen Sensor Green-t (SOSG) megvilágítással, az Amplex Red-et (AR) pedig H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal, majd ezeket az oxidált formákat juttattuk a levélbe.

Mivel csak az erősen fluoreszkáló vegyületek detektálhatóak, az SOSG és az AR esetében fel kellett tételezzük, hogy maguk a vegyületek, ill. oxidált formáik azonos módon lokalizálódnak a növényi sejtekben. A vizsgált vegyületek vizes oldatait a levelek adaxiális oldalán túvel szűrt kis nyíláson keresztül, fecskendővel jutattuk a levelekbe. Ezzel a módszerrel, fajonként változóan 0.5-4 cm<sup>2</sup>-es levélterületek infiltrálhatóak, melyekből az infiltrálás után azonnal, illetve 20-40 perces inkubálás után vágtuk ki a mikroszkóp mintatartójára helyezhető kis darabokat. A levelekben a zárósejteket részben a pásztázó lézer mikroszkóp transzmissziós képeiből, részben a kloroplasztiszok helyét kijelölő klorofill fluoreszcencia alapján lokalizáltuk. Megvizsgáltuk bejutnak-e az alkalmazott vegyületek a zárósejtekbe, illetve a zárósejtek kloroplasztiszába.

Eredményeink azt mutatták, hogy a danzil fluorofórt tartalmazó DanePy nem jutott be a zárósejtekbe sem alapvegyületként sem pedig vízdékonyabb oxalát sóként, mivel mindkét vegyület jelenléte (fluoreszcenciája) az epidermisz sejtek közti térre illetve a zárósejtek légrésére korlátozódott. Érdekes eredményeket kaptunk a szintén szingulett oxigén jelzőként ismert SOSG oxidált formájával, ami többször csak a zárósejtek felébe jutott be. Jó eredményeket értünk el azonban a hidrogén-peroxid ( $H_2O_2$ ) kimutatására alkalmas, az irodalomban már elfogadott  $H_2O_2$  jelző az Amplex Red (AR) alkalmazásával. Ennek előoxidált formája (a resorufin) *Vicia faba* levelekben eljutott a zárósejtekbe, így ezek a minták alkalmasnak bizonyultak további, AR-el végzett  $H_2O_2$ -ot kimutató kísérletekre. *Arabidopsis* levelekben az előkísérletek nem voltak eredményesek, a resorufin csak kis mértékben jutott be a zárósejtekbe, így ezekben a további kísérleteket egyelőre *Vicia faba* levelekre korlátoztuk.

A zárósejtekben megjelenő nitrogén-monoxidot (NO) 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein (DAF-FM) diacetáttal jelöltük. Ehhez a kontroll és az elicitorral kezelt levelekről epidermisz nyúzatokat készítettünk, melyekhez sötétben adtuk a kumulatív fluoreszcens reagenst. A mintákat párban hasonlítottuk össze, hogy a jelölődésre egyforma időt biztosítsunk.

### **Elicitorok jelátviteli útjának gyors térképezése fejlesztett új módszer**

Mivel a NO vagy a  $H_2O_2$  jelátvivő molekulák akkumulációját zárósejtekben biotikus és abiotikus stressz során rendszerint csak 2-3 órával a stresszor megjelenése után detektálják, kíváncsiak voltuk arra, hogy a NO akkumuláció kinetikája vajon hogyan alakul egy elicitor hozzáadása után. Pozitív kontrollként abszcizinsavas (ABA) és  $H_2O_2$ -os kezelést alkalmaztunk. A NO-ot egy specifikus és kumulatív fluoreszcens jelölővel (DAF-FM DA) mutattuk ki, míg más mintákon általános ROS jelölőként a H2DCF-DA fluoreszcens festéket használtuk.

A kísérleteinkben alkalmazott Leica TCS SP5 konfokális lézerpasztázó mikroszkóp motoros tárgyasztala a tér három tengelye mentén, programozható módon képes visszatérni egy megadott fókuszpontba, mely képességét az alábbi kísérletekben felhasználtuk. *Vicia faba* növény harmadik levélemeletéről vett, a levél közepéről származó abaxiális nyúzatot feldaraboltunk és a nyúzatdarabokat a 8 mintatartót tartalmazó mintalemez tálkáiban dróthálával lefogattuk. A pozíciók programozása után lehetőség nyílt nyúzatokként 3 látómezőről felvételt készíteni, és így a 8 tálka 24 felvételét a rendszerrel kevesebb, mint 3 perc alatt elkészíthetjük.

A tálkákban a nyúzatokon különböző kezeléseket végeztünk az előzetesen DAF-FM DA illetve H2DCF-DA festett mintákon. Az elrendezés lehetőséget nyújtott arra, hogy ugyanazon levél egyazon helyéről származó sztómák működését azonos időpontban, de különböző kezelés mellett egymással összehasonlítva mérhessük. Megállapítottuk, hogy a zárósejtek NO szintje  $100 \mu M$   $H_2O_2$  hozzáadása után telítődő jelleggel emelkedik, és a telítés a 75. perc körül következik be (+40%). ABA hozzáadása után a NO szint lassabb ütemben, de folytonosan emelkedik, ám az  $50 \mu M$  ABA kezelés esetén a 75. percre sem telítődik. A  $10 \mu M$  ABA kezelés utáni NO jel emelkedés üteme egészen a 40. percig megegyezik az  $50 \mu M$ -os ABA kezeléssel, ami tovább nem folytatódik és eléri a maximumát (+20%). Megállapítottuk, hogy a ROS-jelölő H2DCF-DA festés kísérleti rendszerünkben nem működik, ugyanis a jelölő fluoreszcencia intenzitása a kezelés minőségétől függetlenül drasztikus módon és azonos mértékben csökken. Visszatérünk emiatt a  $H_2O_2$  Amplex Red festéssel való kimutatásához.

Megvizsgáltuk azt is, hogy reggeli kezelések után 3 órával az aktuális NO szint vajon hogyan alakul. A 8.00-kor nyúzott mintákat fényen ABA-val kezelve és a mintákat 11.00-kor festve úgy találtuk, hogy az NO akkumuláció a kezelés után 3 órával a duplájára emelkedett. Ha az ABA kezelést reggel 8.00-kor a növényen végeztük el, akkor viszont nem tapasztaltunk jelentős NO gyarapodást a kezelés után 3 órával. A párhuzamosan vizsgált sztómányitódás gátlás a fentiekkel összhangban a nyúzatokon végzett kezelés esetén volt nagyobb mértékű. A beállított rendszer alkalmas tehát elicitorok jelátvitelének tanulmányozására, az említett jelmolekulák akkumulációs kinetikájának a sztómazáródás mértékével párhuzamos nyomon követésére.

## **A NO hatása zárósejt fotoszintézisére; a NO és ROS szabályozás összefüggéseinek vizsgálata**

NO donor molekulák és specifikus NO-elektroda alkalmazásával és PAM-módszerrel korábban kimutattuk, hogy NO hozzáadásával a zárósejtek kloroplasztiszainak relatív fluoreszcencia hatásfoka gyorsan emelkedik, majd lassan és folytonosan csökken. A jelenség hátterét kutatva mára megállapítottuk, hogy a NO azonnal 0 körüli értékre csökkenti a  $qP$  és  $qL$  quenching együtthatókat, az effektív kvantumhatásfokot ( $\Phi_{PSII}$ ) és a nem-fotokémiai kioltást (NPQ), ám mindezt eltérő kinetikával. Az NPQ  $qE$  komponense a csökkenést követően lassan és folytonosan emelkedni kezd. Az emelkedés alacsony ETR mellett történik, tehát  $qE$  növekedésének hátterében az ATP-t igénylő folyamatok gátlása állhat (korábban már kimutatták a NO ATP-szintáz és Rubisco gátlását is). Megmutattuk azt is, hogy a NO zárósejtekben is a  $Q_A$  és  $Q_B$  közti nem-hem vashoz kapcsolódva csökkenti  $qP$ ,  $qL$  és  $\Phi_{PSII}$  paramétereiket, ugyanis a NO mellett megfelelően magas koncentrációban alkalmazott bikarbonáttal a NO a vas(II) megfelelő koordinációs helyéről leszorítható. A bikarbonátos kezelés után  $qP$ ,  $qL$ , NPQ és  $\Phi_{PSII}$  emelkedik, míg  $F_v'/F_m'$ , azaz a megvilágítás közben mérhető maximális kvantumhatásfok csökken. Eredményeink legfontosabb élettani következtetése az, hogy a NO a sztómazáródásban betöltött jelátviteli funkción túl reverzibilisen gátolja a fotoszintetikus lineáris elektrontranszportláncot, ezzel az ozmoregulációhoz rendelkezésre álló NADPH és ATP mennyiségét. Kutatási eredményünket a Journal of Experimental Botany folyóiratban publikáltuk.

## **Általános rezisztenciát (BR) indukáló elicitorok (flg22, xantán, ergoszterol, koleszterin, kitozán) tesztelése**

A különféle MAMP, DAMP és effektor molekulák alkalmazásával arra voltunk kíváncsiak, hogy az általános patogén-aktivált jelátviteli utat aktiváló vegyületek vajon befolyásolják-e a növények sztómaműködését. A vizsgált növények az *Arabidopsis* (vad típus és jelátviteli mutánsok), a membrántranszport modellnövény *Vicia faba*, a fotoszintézis mérésekhez általánosan használt *Pisum sativum* és tanszékünkön a szalicilsav jelátvitel tanulmányozásában használt *Solanum lycopersicum* fajok voltak. Tesztrendszerünkben nyúzatkészítés utáni gyors, mikroszkópos felvételeken alapuló sztómaporus mérést, és a LI-COR 6400 készülék teljes *Arabidopsis* növény feltétjét használtuk. A teljes növény kiegészítő lehetőséget nyújtott arra, hogy az amúgy még egyetlen levélen belül is rendkívül variábilis sztómakonduktanciát a növény teljes rozettájának átlagaként értékelhessük. A további előnye az volt, hogy a transzspiráció mellett a  $CO_2$  asszimilációját is mérhettük a kamrába

épített, változtatható minőségű (vörös:kék:zöld LED arányok) és intenzitású megvilágítás mellett.

## flg22

Megállapítottuk, hogy a bakteriális flagellin flg22 epitópja nem viselkedik általános sztómazáró hatású vegyületként, mert ugyan Arabidopsisban és paradicsomban szignifikánsan csökkenti a sztómanyitottságot, de a pillangósokra nem volt hatással. Ez utóbbi azért meglepő, mert az flg22 PRR receptora a magasabbrendű növények között evolúciós szempontból ősi fehérjének számít (Boller and Felix 2009).

*Arabidopsis thaliana* modellnövényben a flagellin flg22 epitópja a G-fehérjéhez kapcsolt jelátviteli úton indukál sztómazáródást, melyet *gpa1-3* és *gpa1-4* G-fehérje  $\alpha$ -alegység mutánsok segítségével igazoltunk. flg22 kezelésre a vad típusú Arabidopsis Col-0 zárósejtjeiben NO akkumulálódik, mely a *gpa1-3* és *gpa1-4* mutánsokban nem figyelhető meg.

*Vicia faba* modellnövényben a flg22 nem okoz sztómazáródást, melyet nyúzatokon és intakt növényeken porométeres mérésekkel is igazoltunk. Ezzel ellentétben flg22 megakadályozza a kora reggeli sztómanyitódást, mely jól jelzi, hogy a sztómanyitódás és záródás szabályozása eltérő jelátviteli utakat használ.

*Solanum lycopersicum* és *Pisum sativum* modellnövényekben a flg22-nek nem volt hatása.

A zárósejtek kloroplasztizai a sztómaműködésben ROS-ok, ATP és a citoszolikus malát szintézishez szükséges NADPH termelésével közvetlenül is részt vesznek. A zárósejtek önálló fotoszintetikus aktivitása tehát ugyancsak fontos szabályozó lehet, ezért az elicitor-kezelés után Microscopy-PAM készülék segítségével az egyes sztómák klorofill fluoreszcencia paramétereit is rögzítettük. A gyors fényválasz görbék alapján úgy tűnik, hogy a flg22 kezelés nincs hatással a lineáris elektrontranszportlánc sebességére (ETR).

## Xantán

*Solanum lycopersicum* és *Pisum sativum* növényekben a xantán jelentős sztómazáródást okozott.

*Vicia faba* növényben a xantán 1 mg/ml koncentrációjú oldata mérsékelt gátlást okozott a sztómák nyitódásában és ugyancsak mérsékelt sztómazáródást okoz, melyet nyúzatokon és intakt növényeken porométeres mérésekkel is igazoltunk.

Az LI-6400 (LI-COR Biosciences, Inc.) fotoszintézismérő készülék kiegészítő egységével, a Leaf Chamber Fluorometer (LCF) mérőfejjel végzett kísérletek szerint a xantán egyetlen napszakban sem befolyásolta *Vicia faba* növények zárósejtjeinek fotoszintetikus aktivitását. Megállapítottuk, hogy a xantán számottevően nem befolyásolta *V. faba* növények zárósejtjeinek nitrogén-monoxid és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mennyiségét sem.

Az LI-6400 rendszer egyik kiegészítő egysége, a (jelen pályázatban beszerzett) 6400-17 Arabidopsis Whole Plant Chamber (AWC) és az ehhez csatlakoztatható 6400-18 RGB fényforrás segítségével egy teljes *Arabidopsis* növény CO<sub>2</sub> asszimilációja és transzspirációja nyomon követhető. Próbaméréseket végeztünk abszcizinsavval (ABA) kezelt *Arabidopsis* növényeken, hogy megállapíthassuk milyen érzékenyen befolyásolja a transzspiráció és asszimiláció értékét egy más fajban sztómazáró hatású anyag.

Az ABA az *Arabidopsis* növények transzspirációját kis mértékben, míg CO<sub>2</sub> asszimilációját jelentősen befolyásolta. Az eredményből arra következtettünk, hogy ez a

mérőkamra alkalmas lehet a xantán teljes növény transzspirációjára és CO<sub>2</sub> asszimilációjára gyakorolt hatásának egész napos vizsgálatára.

## Ergoszterol és koleszterol

*Vicia faba* növényben egyik vizsgált elicitor sem csökkenti a sztómakonduktancia értékeket, sőt az ergoszterol átmeneti emelkedést is okoz benne.

## ***A KITOZÁN HATÁSA A ZÁRÓSEJTEK MŰKÖDÉSÉRE***

Munkánkban az egyik legáltalánosabb gomba MAMP, a kitozán sztómaműködésre gyakorolt hatását lóbab (*Vicia faba* L.) modellnövényen vizsgáltuk részletesebben. 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 vizsgálata volt.

Az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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?

A zárósejtek környezetében lévő parenchima réteg mezofillum sejtjei vajon befolyásolják-e a kitozán sztómaműködésre gyakorolt hatását?

Vajon a kitozán befolyásolja-e a zárósejtek fotoszintetikus aktivitását, ezáltal csökkentve vagy növelve a záródáshoz és nyitódáshoz szükséges ATP és NADPH mennyiségét?

## **A kísérletekhez felhasznált 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<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,5 mM KCl, 0,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,001 mM MnSO<sub>4</sub>, 0,005 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0,0001 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 0,01 mM H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, és 0,02 mM Fe(III)-EDTA, pH 6,0). 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 μmol foton m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> volt.

Kísérleti oldatok:

- Inkubációs oldat : 10 mM MES, 10 mM KCl, 100 μM CaCl<sub>2</sub> (pH 6,15 TRIS)

- 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  alacsony molekula tömegű (LMW) kitozán oldat 1 mM Na-acetát tartalmú inkubációs oldatban oldva
- S-nitrozo-glutation (GSNO), mint NO donor vegyület
- 100  $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$

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 sztómányitódás gátlásának vizsgálata), míg a napközbeni kísérletek esetében 10:00-kor (a sztómazáródás indukciójának és a sztómányitódás gátlásának vizsgálat) inkubációs oldattal, kontrollként és 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  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 elemeztünk.

A fluoreszcencia indukció és kioltási analízis során a következő paramétereket vizsgáltuk (a gyors fényválasz görbék alapján):

- A sötétadaptált PSII reakciócentrumok (RC) maximális kvantumhatásfokát ( $F_v/F_m$ )
- A fotokémiai kioltási együtthatókat ( $q_P$  és  $q_L$ ), melyek a nyitott PSII reakciócentrumok részarányát becsülik nem-kapcsolt ( $q_P$ ) és kapcsolt ( $q_L$ ) 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  (AmplexRed, 1 mM) és a NO (DAF-FM, 10  $\mu\text{M}$ ) 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 és értékelésük

### A kitozán a sztómányitódást hajnalban gátolja, napközben pedig további nyitódás- gátlást és enyhe záródást okoz

A növényi sejtek, így a zárósejtek is nagyszámú sejt felszíni receptorral rendelkeznek plazmamembránjukban, melyek a legkülönbébb MAMP vegyület felismerésére képesek (Pel and Pieterse 2013). A kitozán érzékelésére eddig két lehetséges receptort találtak, az egyik a kitin elicitor-kötő fehérje (CEBiP) (Kaku et al. 2006) a másik pedig a rizs (*Oryza sativa*) kitin elicitor receptor kináza (*OsCERK*), ami a rizsben nélkülözhetetlennek tűnik a kitin fragmentumok érzékelésében.

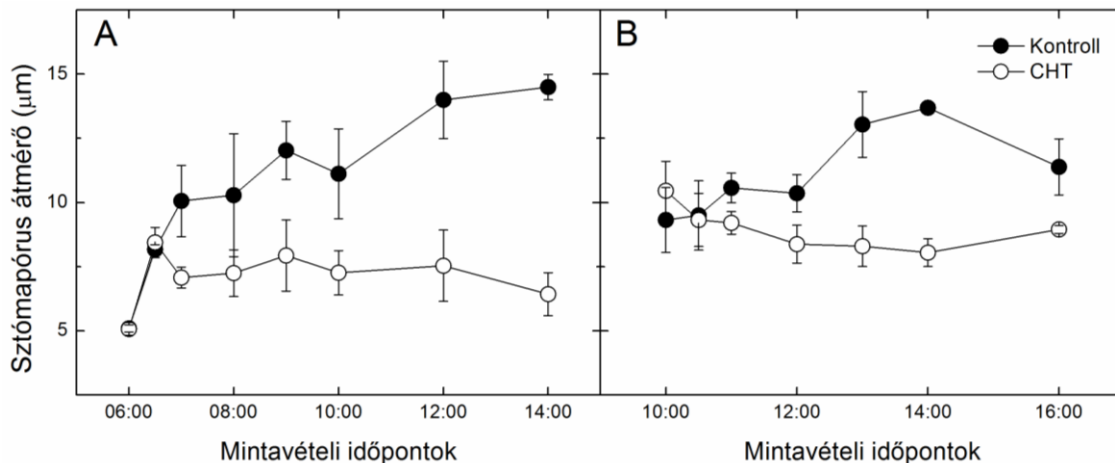
A sztómányitódás és záródás igen szerteágazó jelátviteli utak és transzporterek aktiválódását igényli. Mivel a kitozán hatását egyaránt kifejtheti a nyitódáshoz és a záródáshoz szükséges folyamatokra, így a kezeléseket két fő csoportra osztottuk. Az egyikben a kezelést hajnalban, sötétben végeztük, mikor 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 sztómányílás 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 (1. 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 az 1. 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 (1. 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 sztómányitódás 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.





1. ábra A sztómaporus átmérők változása kontroll és 100 µg ml<sup>-1</sup> kitozán-kezelt (CHT) növények esetében a nap folyamán. A kezelések 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 (± SD) megjelenítésével.

A kitozán hatására, hajnali kezelés esetén sztómamozgás 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 tonoplast membránpotenciáljának megváltozására aktiválódó vagy inaktiválódó transzporterek állnak. A sztómamozgás (PM hiperpolarizáció) és záródás (PM depolarizáció) során egyaránt a K<sup>+</sup> ioncsatornák töltik be a legfontosabb szerepet. A fényaktivált nyitódás során közvetetten a PM H<sup>+</sup>-ATPáz működésének hatására aktiválódnak a befelé egyenirányító K<sup>+</sup>-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<sup>+</sup><sub>out</sub>-csatornákat. Koers és munkatársai (Koers et al. 2011) 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 sztómamozgást. A napközbeni erőteljes sztómazáródás elmaradásának egyik oka feltehetően a nagy mennyiségben termelődő jelátvivő molekula, a NO egyik, Sokolovski és munkatársai (Sokolovski and Blatt 2004) által kimutatott hatásával magyarázható. Eszerint a NO a zárósejt K<sup>+</sup><sub>out</sub> ionáramát biztosító GORK ioncsatornát S-nitrozilálja, ezáltal inaktiválva azt. Működőképes GORK ioncsatornák hiányában pedig a zárósejtek képtelenek a sztómazáródás kiváltására.

### 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 (Pei et al. 1997; Roelfsema et al. 2004). Receptoraikat vizsgálva azt találhatjuk, hogy míg az ABS esetében intracelluláris és extracelluláris receptorok felelősek az érzékelésért (Ma et al. 2009), addig MAMP esetében az érzékelés a sejt felszínén megy végbe (Boller and Felix 2009). Az ABS és MAMP érzékelését követő jelátviteli utak több közös komponenst is tartalmaznak. *Arabidopsis*-ban, a zárósejt specifikus OST1 protein kináz aktiválódása nélkülözhetetlen a sztómazáródás kiváltásához, mind az ABS, mind pedig például az flg22

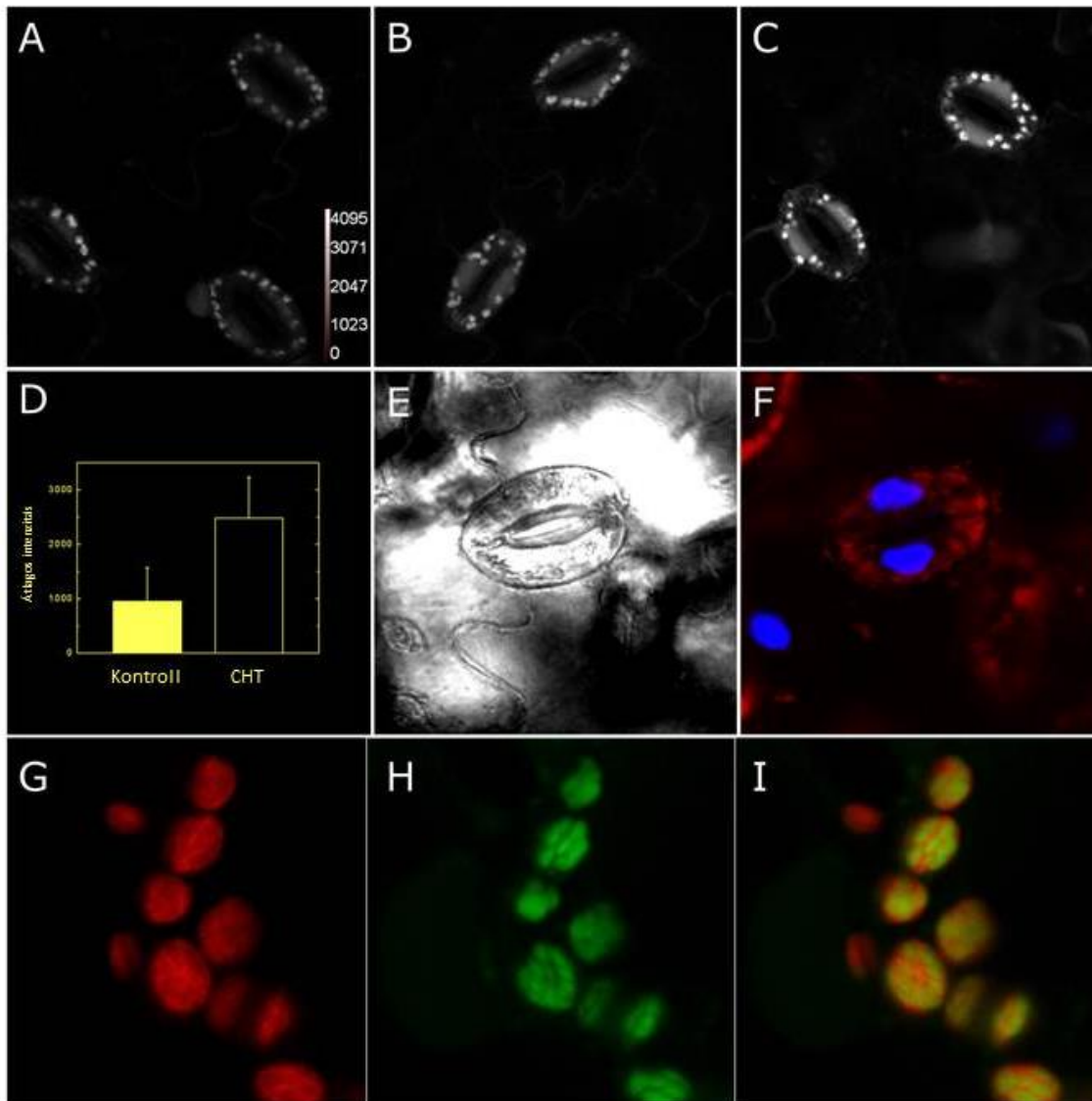
esetében (Melotto et al. 2006; Mustilli et al. 2002). Az OST1 kinázról nemrégén mutatták ki, hogy képes egy S-típusú anion csatorna, a SLAC1 aktiválására (Geiger et al. 2009; Jammes et al. 2009), utalva arra, hogy az OST1 állhat a MAMP-aktivált anionáram hátterében is. Mindennek ismeretében érdekes, 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 (Kolla and Raghavendra 2007; Kolla et al. 2007; MacRobbie 2000; Neill et al. 2002; Suhita et al. 2004). Srivastava és munkatársai (Srivastava et al. 2009) 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.

### **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 (2. ábra, C). A 2. 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 (2. 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 (2. ábra A és B), a későbbi vizsgálatok során kontrollként csak az 1 mM nátrium-acetátot tartalmazó inkubációs oldatot használtuk.

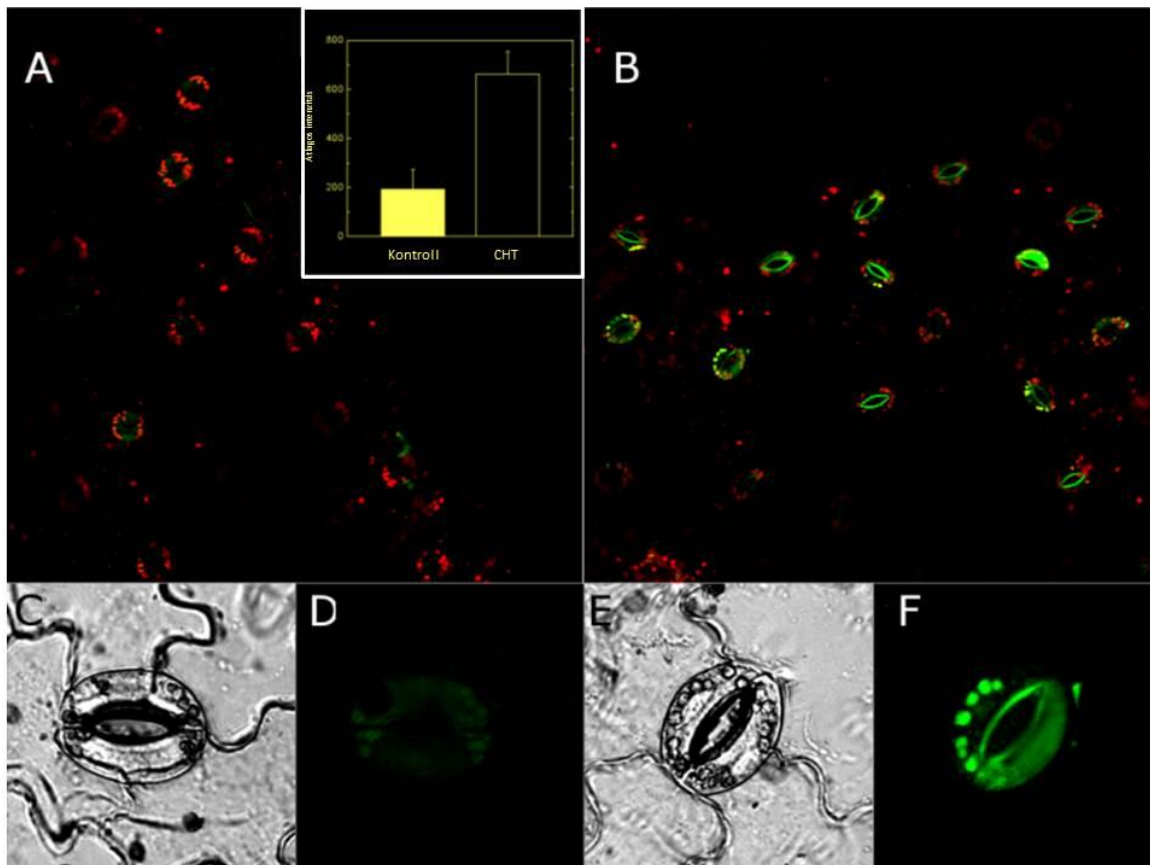


2. ábra A specifikus  $H_2O_2$  jelölő AR eloszlása a kontroll (A), acetátos kontroll (B) és kitozán-kezelt (C) levelek esetében. Az átlagos AR intenzitások (D) jól mutatják, hogy a kitozán hatására megemelkedik a  $H_2O_2$  szintje az acetátos kontrollhoz képest. A  $H_2O_2$  elsősorban a kloroplasztiszokban, ezen belül is feltehetően a sztrómában (G-I), és a sejtmagvakban 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.

### ***A kitozán-kezelés hatására keletkező NO detektálása***

A  $H_2O_2$  jelátvivőt is magába foglaló, sztómazáródást 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 3. 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 tudunk detektálni.



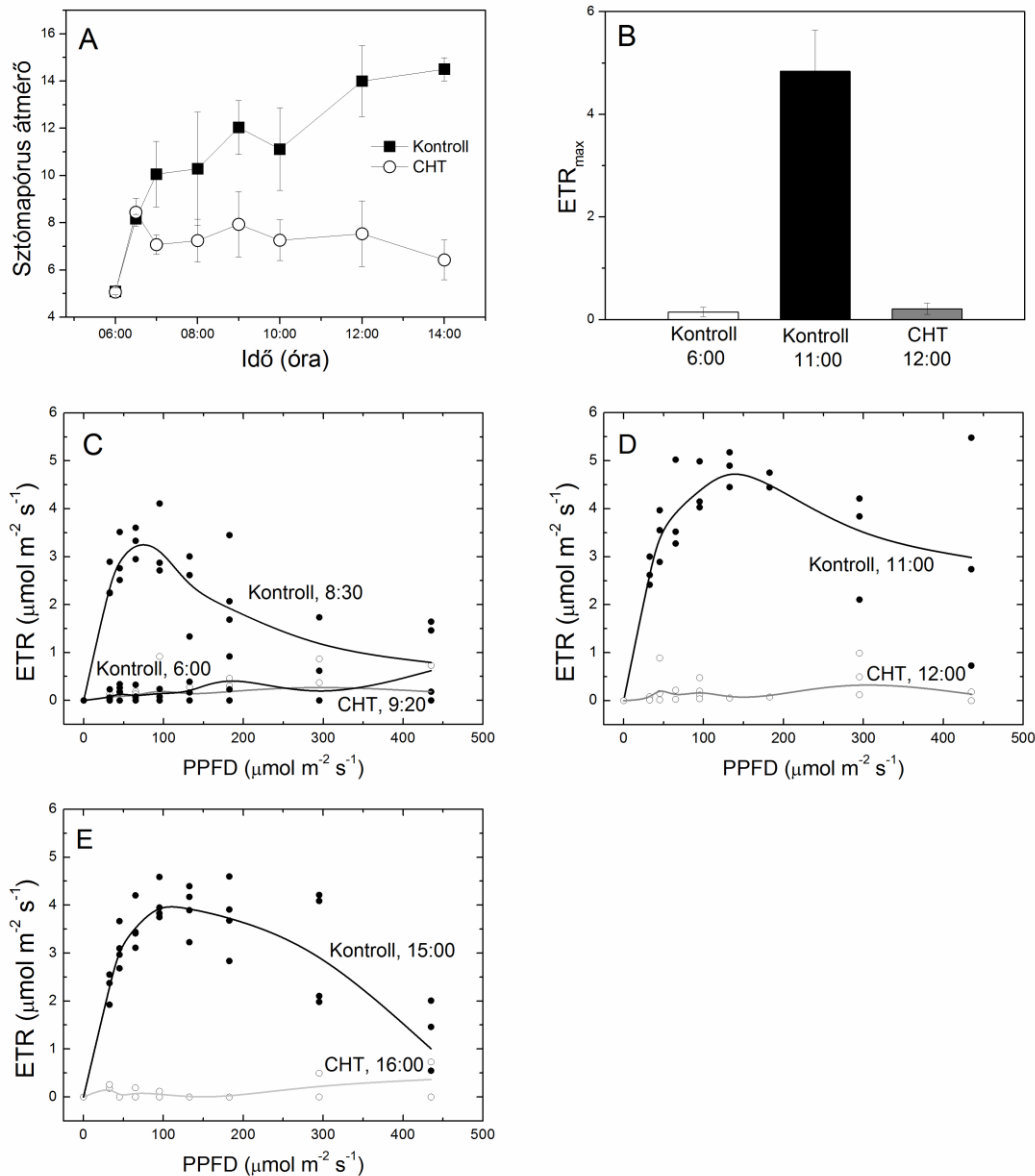
3. ábra Az A-B ábrákon a 10  $\mu$ M DAF-FM-mel jelölt kontroll (A) és kitozán előkezelt (B) nyúzatok mikroszkópos felvételeit láthatjuk. A kis nagyítású felvételeken jól látható a különbség a kontroll és a kitozán-kezelt minták sztómái között (zöld – DAF fluoreszcencia, piros – klorofill autofluoreszcencia). 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.

## A kitozán hatása a zárósejtek fotoszintézisére

### 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 (4. ábra; A-B). Ezzel ellentétben, a kitozán-kezelt zárósejtek, a nap folyamán bármely AL intenzitáson minimális ETR értékkel rendelkeztek (4. ábra; C-E).



4. 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, szürkevonallal – kitozán-kezelt minták ETR-értékeinek átlagai).

### **A fotoszintetikus paraméterek alakulása hajnali kitozán-kezelés után**

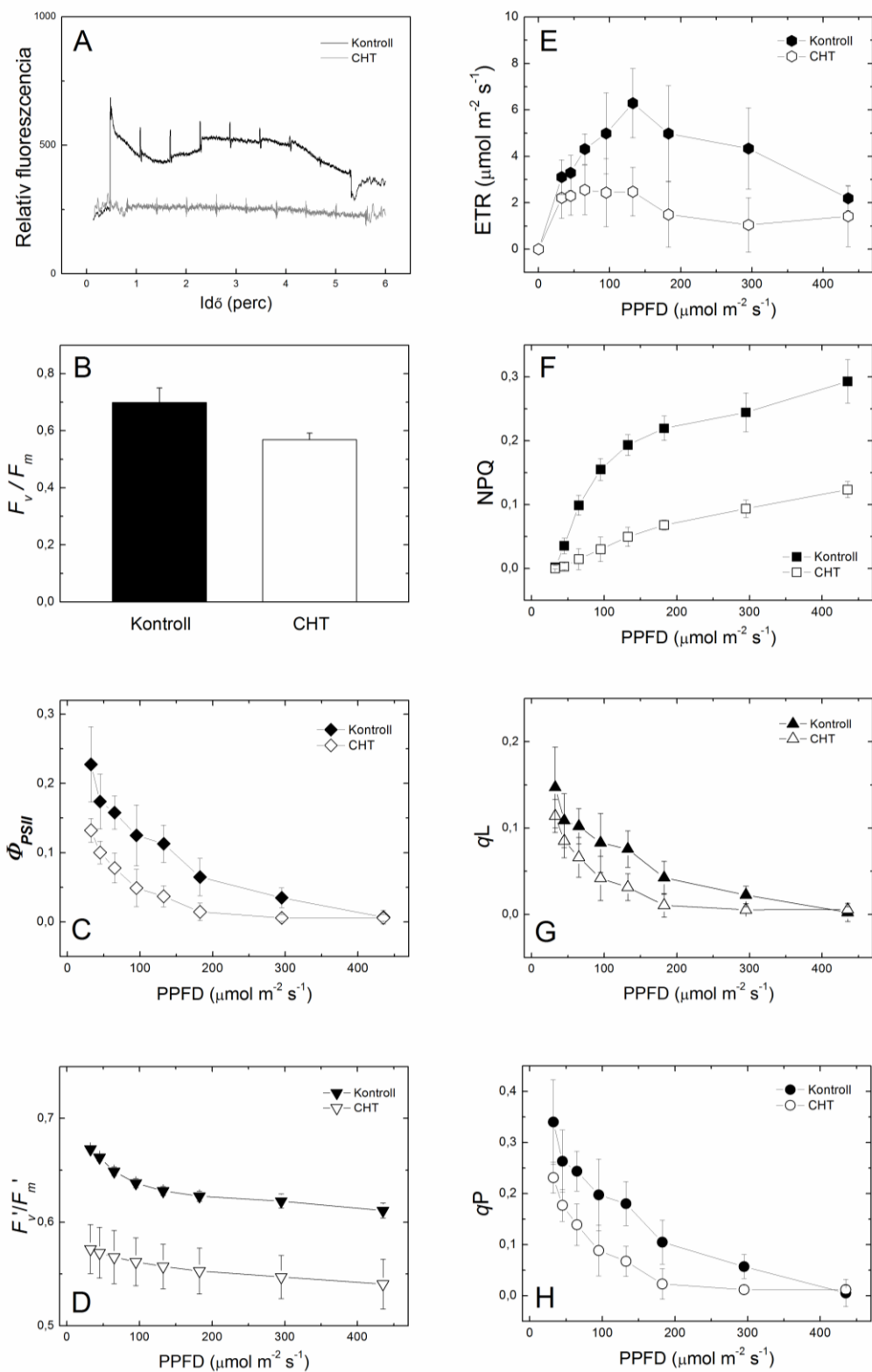
A kitozán-kezelés hatására bekövetkező elektrontranszportlánc gátlás hátterét kutatva megvizsgáltuk az RLC protokoll során mért egyéb fluoreszcencia paraméterek alakulását is. Az 5. ábra a hajnali kitozán-kezelés hatását mutatja az  $F_v/F_m$ , a  $\Phi_{PSII}$ , az NPQ, az  $F_v'/F_m'$ , a  $qL$  és 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 (5. ábra, B). Ennek hátterében elsősorban az  $F_m$  csökkenése áll (5. 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 (5. ábra, E).

Az 5. ábrán látható, hogy  $\Phi_{PSII}$  csökkenéséhez a  $qP$  és az  $F_v'/F_m'$  csökkenése is, bár más és más módon, de egyaránt hozzájárul (5. 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 (5. ábra, G).

Az NPQ szintén jelentős módon redukálódott minden AL intenzitás esetén (5. ábra, F).



5. 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.

## A fotoszintetikus paraméterek alakulása napközbeni kitozán-kezelés után

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

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.

## A külső H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés hatása a zárósejtek fluoreszcencia paramétereire

Vajon a zárósejtek kloroplasztiszaiban 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 zárósejteket 15 percig sötét adaptáltuk 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 sötétadaptáltuk 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, az  $F_v/F_m$ , a  $\Phi_{PSII}$ , a  $qP$ , az ETR és az NPQ paraméterek nem szignifikáns mértékben csökkentek. 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. A  $qL$  paraméter, azaz a PSII hatékonysági faktora kismértékű emelkedésének hátterében a tilakoid-kapcsolt és a sztrómában 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.

## 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 nyúzatot sejtszintű klorofill *a* fluoreszcencia méréssel *in vivo* próbáljuk igazolni feltevésünket.

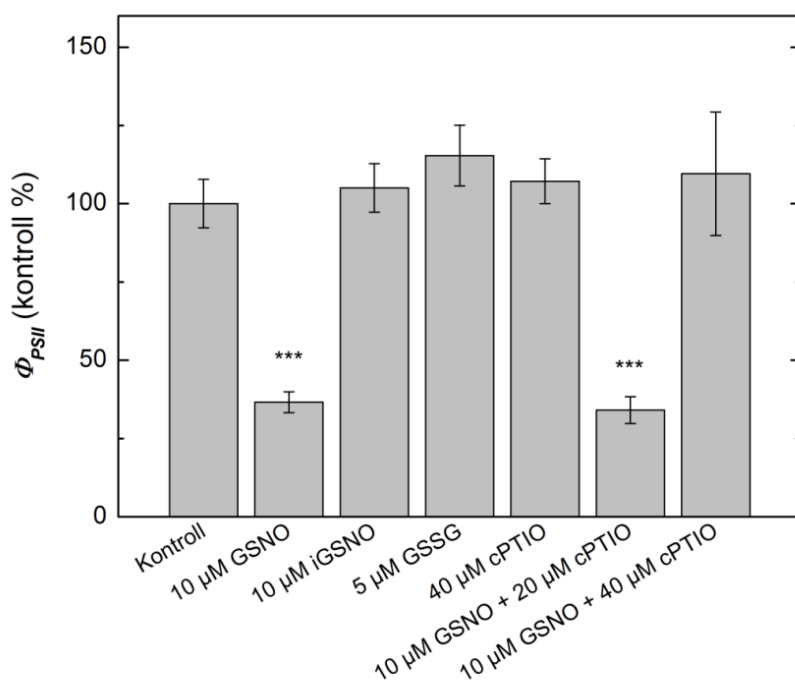
## Az NO-donor GSNO specifikussága, fotolízise melléktermékeinek hatásai és a GSNO-ból felszabaduló NO mennyisége

Mielőtt a NO a zárósejtek fotoszintetikus aktivitására gyakorolt hatását megvizsgáltuk, a kísérleteinkben használt NO-donor GSNO specifikusságát 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 sötétben adaptáltuk, majd különböző kísérleti oldatokban, 15 percen keresztül,  $500 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  intenzitású fehér fényvel világítottuk meg őket. Azt tapasztaltuk, hogy  $10 \mu\text{M}$  GSNO alkalmazása mellett az egyensúlyi  $\Phi_{PSII}$  jelentősen csökken (6. ábra). Ezzel szemben, ha nyitott edényben 24 órás,  $500 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  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 (Michelet et al. 2005). 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 (6. 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).



6. ábra A zárósejtek egyensúlyi  $\Phi_{PSII}$  paraméterének alakulása 15 perces,  $500 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD AL fehér fényel 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

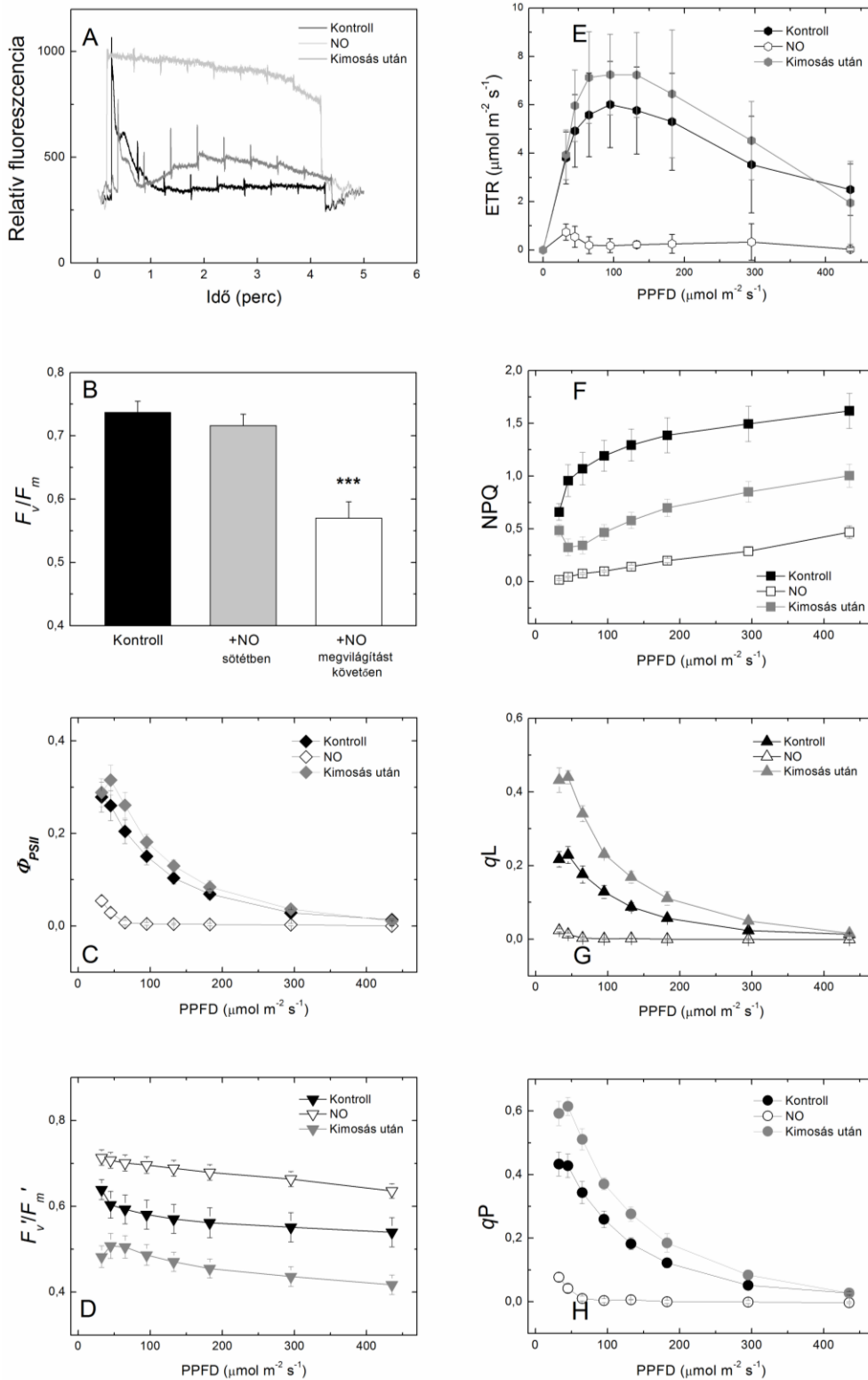
oldatcserélő rendszeren keresztül juttattuk a mikroszkóp tárgyasztalán sötétben lévő Petri-csészébe. A NO elektródot a Petri-csészébe merítettük, és azt tapasztaltuk, hogy benne a NO koncentrációja az oldatcsere elindítását követő 1 perces lag fázis után 3-4 perc alatt 450 nM fölé emelkedett, és ezen érték közelében további 10 percen többé kevésbé állandónak is bizonyult. A NO kimosásához NO-mentes inkubációs oldatot használtunk. A NO kimosódása az oldatcsere indítását követően 1-2 percen belül elkezdődik, és nagyjából 10 perc alatt be is fejeződik.

### **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 görbét 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 kitozánkezelések 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 (7. A-H ábra).

A 7. 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 (7. 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 (7. ábra, B). Az effektív kvantumhatásfok  $\Phi_{PSII}$  értékei minden fényintenzitáson jelentős csökkenést mutattak a kontrollhoz képest (7. ábra, C).  $\Phi_{PSII}$  csökkenésében a  $qP$  komponensének gyengülése áll (7. ábra, H), mely a kapcsolt reakciócentrumokat feltételező fotokémiai kioltási együttható,  $qL$  esetében ugyanúgy megfigyelhető (7. 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 (7. ábra, D). A növekedés mögött feltehetően a nem-fotokémiai kioltási folyamatok, legnagyobb részben a hődisszipáció térvesztése állhat, amit jól mutat az NPQ paraméter minden egyes AL fényintenzitásnál tapasztalható csökkenése is (7. 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 futtattuk. 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 (7. C-H ábra, Kimosás után).



7. 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  $\Phi_{PSII}$ ,  $qP$ , 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,

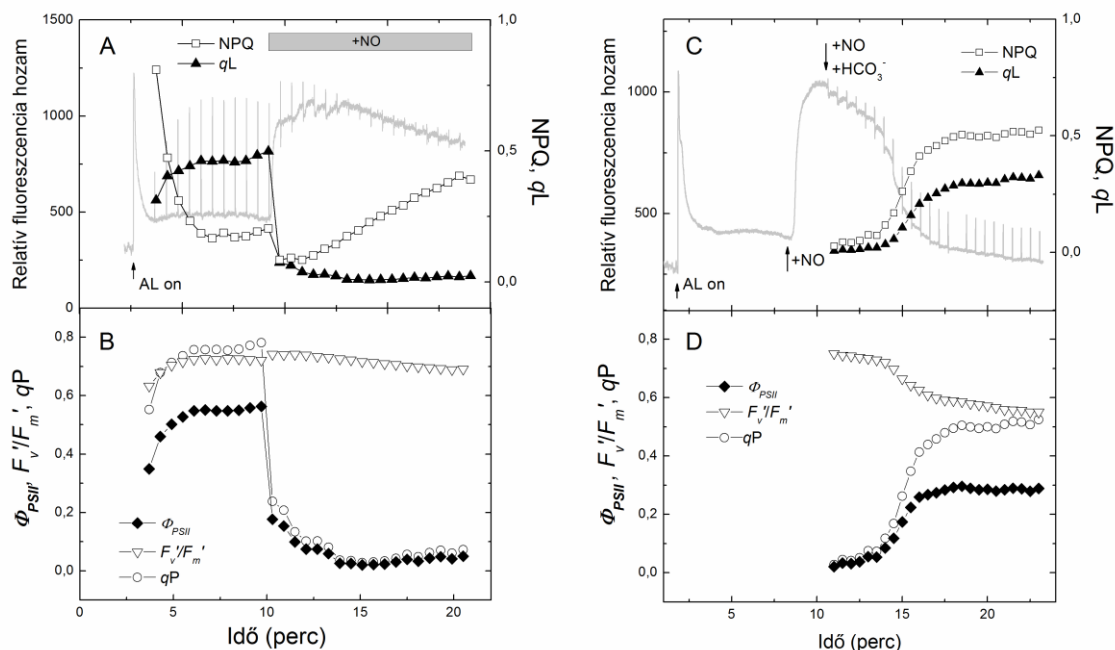
a szórások ( $\pm$ SD) feltüntetésével. A statisztikai elemzéshez a Student-féle t-próbát használtuk (\*\*\*)  $P < 0.001$ ).

### **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 (8. 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 percen (8. ábra, A, B).

### **A NO mellé adott bikarbonát helyreállítja $qP$ -t és fokozza az NPQ konstans emelkedését**

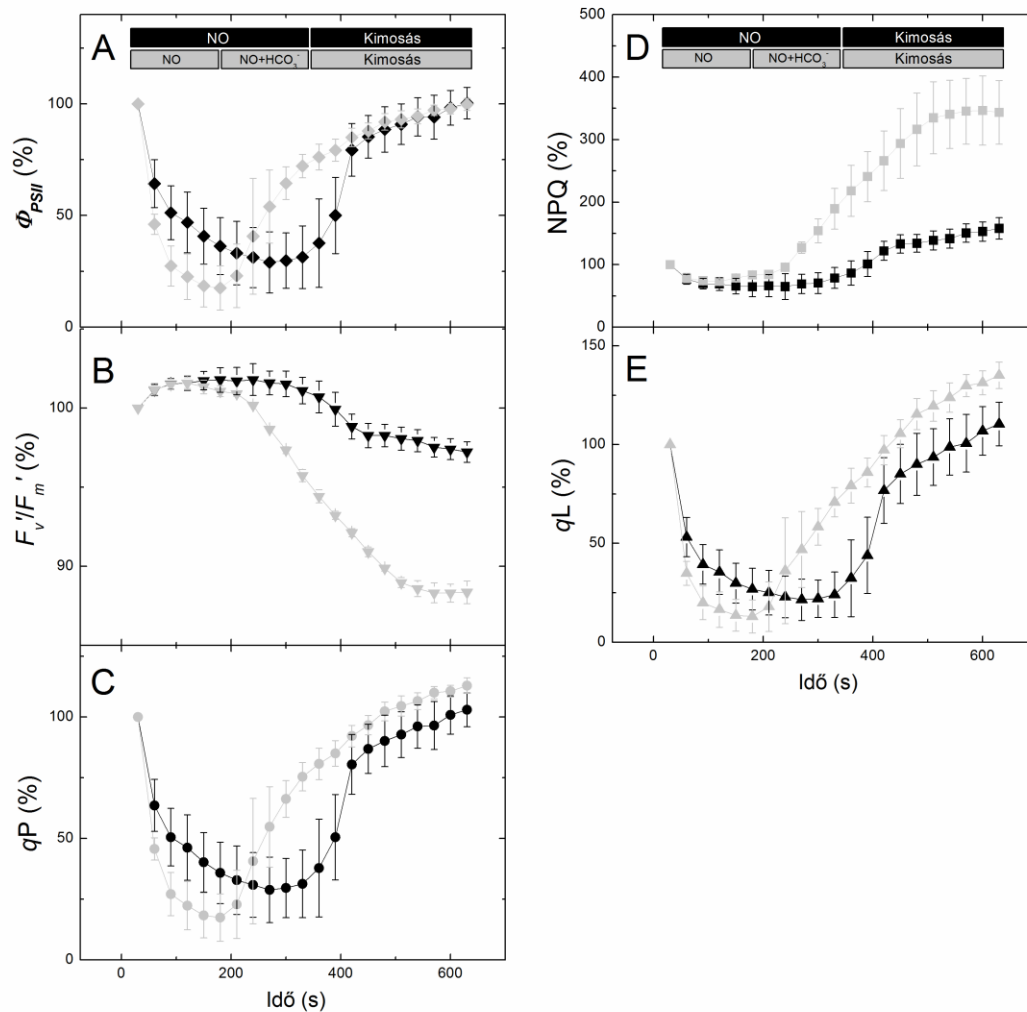
Korábbi eredmények szerint a NO a bikarbonátot a  $Q_A$  és  $Q_B$  kinonok közti nem-hem  $\text{Fe}^{2+}$  egyik koordinációs kötőhelyéért versengve leszorítja, és ezzel csökkenti az elektrontranszfer sebességét (Diner and Petrouleas 1990; Goussias et al. 2002). A nyúzat fürdőoldatában a 450 nM NO-hoz 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 (8. 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.



8. ábra Két jellemző mérés relatív fluoreszcencia hozama, NPQ,  $q_L$ ,  $\Phi_{PSII}$ ,  $F_v'/F_m'$  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  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$  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 nM NO-t tartalmazó oldattal való átmosás időtartamát mutatja. A fluoreszcencia hozam meredek emelkedését az NPQ (A), a  $q_L$  (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 sejtfürdő oldatot 450 nM NO + 100 mM  $\text{KHCO}_3$  tartalmú oldatra cseréltük.

### 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  $q_L$  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 (9. ábra fekete szimbólumok). Amikor a NO + bikarbonátot tartalmazó oldatot NO- és bikarbonátmentes oldatra cseréltük, a  $\Phi_{PSII}$ , a  $qP$ , az NPQ és a  $q_L$  paraméterek növekedési üteme lassult (9. ábra szürke szimbólumok).



9. 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  $\text{KHCO}_3$  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 ( $n=4$ ,  $\pm\text{SD}$ )

## A kitozán, feltehetően a NO bioszintézisét indukálva, gátolja a zárósejtek fotoszintetikus aktivitását

A zárósejtek kloroplasztisaiban működő lineáris elektrontranszportlánc működését és sztómaműködésben betöltött fontosságát számos tanulmány támasztja alá, mint ahogy ezt Lawson (Lawson 2009) 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 aktiválódtak és jól működő enzimatiszok 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, 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 (Mur et al. 2013). 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 (Shimazaki et al. 2007). 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  $K^+$  és malát<sup>2-</sup> sztómanytódásban 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 sztómanytódást kutatva Talbott és Zeiger igazolta (1993). 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 (Vavasseur and Raghavendra 2005), ám a képződés mértéke ATP és redukáló erő hiányában szintén lecsökkenhet.

A fotofoszforiláció gátlása a PM  $H^+$ -ATPázának aktiválásán alapuló kék fény indukált sztómanytódást csak kis mértékben érintheti. Ennek oka az, hogy a PM  $H^+$ -ATPáz enzimet legnagyobb részben a mitokondriális ATP energizálja (Parvathi and Raghavendra 1995), a kloroplasztiszból származó ATP csak részben járul hozzá mindehhez (Mawson 1993).

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  $H^+$ -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 diffundáló GSNO donor molekula a fehérszövet közvetlenül transz-nitroziláló hatásával, hanem a folyadékokban és a membránokon könnyen átdiffundáló 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.

## KONKLÚZIÓ

A kitozán, a  $\beta$ -1,4-glükózamin láncokból felépülő gomba sejtfalalkotó molekula kék fény-indukált sztómanytódás-gátló, és sztómazáródást serkentő hatását több növényfaj esetében bizonyították. A sztómanytódáshoz 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.

Elsőként igazoltuk, hogy *Vicia faba* esetében a levelek kitozánnal történő permetezése nem indukált sztómazáródást, azonban a sztómanytódást 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 kloroplasztiszáiban 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 sejtfaalakban is megjelent.

Abaxiális epidermisz nyúzatok alkalmazásával hasonló eredményeket kaptunk, melyek segítségével ki tudtuk zárni a mezofillum sejtek kitozán indukált sztómamozgásokban betöltött szerepét.

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.

Mivel a kitozán zárósejtek fotoszintézisére gyakorolt hatását feltehetően a sejt felszíni 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 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  $Fe^{2+}$ -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.

## ***Egyéb környezeti hatással kapcsolatos megfigyelések***

Megállapítottuk, hogy a nevelési fényintenzitásnál ( $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPF) erősebb fény ( $430 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPF) megszünteti az elicitorok indukálta záródást, jelezve azt, hogy a környezeti faktorok felülírhatják a sztómazáródási immunválaszt. Méréseink szerint a növénynevelő kamrában alkalmazott magas páratartalom hasonlóképpen megakadályozza az elicitorok sztómazáró hatását.

## ***A zárósejtek és a mezofillum sejtek fotoszintézisének különbségei***

Kíváncsiak voltuk arra is, hogy a zárósejtek önálló fotoszintézise az eddig megismerteken túl, miben különbözik a mezofillum sejtektől. Megállapítottuk, hogy a zárósejtekből ill. mezofillum sejtekből izolált protoplasztokon mért fényimpulzus indukált klorofill fluoreszcencia lecsengések érdekes eltéréseket mutatnak. A telítő intenzitású, rövid (20 us) fényimpulzussal redukált állapotba hozott elsődleges kinon akceptor, a QA-reoxidációs kinetikájáról a lecsengési görbék kiértékelésével nyerhetünk adatokat. Az illesztett függvény két exponenciális és egy hiperbolikus tagot tartalmaz. Az ún. gyors fázis a QA- akceptor QA-  $\rightarrow$  QB ill. a QA-  $\rightarrow$  QB- reakciók általi reoxidációját írja le. A középső fázis a QA- reoxidációját mutatja azokban a PSII centrumokban, melyekben a QB kötőhely üres a megvilágítás idején. A harmadik, lassú fázis a QA- a vízbontó rendszer S2 ill. S3 állapotaival megvalósuló töltésrekombinációs lépéseit tükrözi. A lecsengési görbék illesztésével ezen három fázis relatív amplitúdóit ill. időállandóit határoztuk meg. A DCMU nélkül mért kinetikák elemzése azt mutatja, hogy QA-  $\rightarrow$  QB(QB-) reakciók gyorsabbak a mezofillum sejtekben, mint a zárósejtekben, míg a töltésrekombinációs lépések közel azonos sebességűek voltak.

## ***A zárósejtek membrántranszportjának vizsgálata***

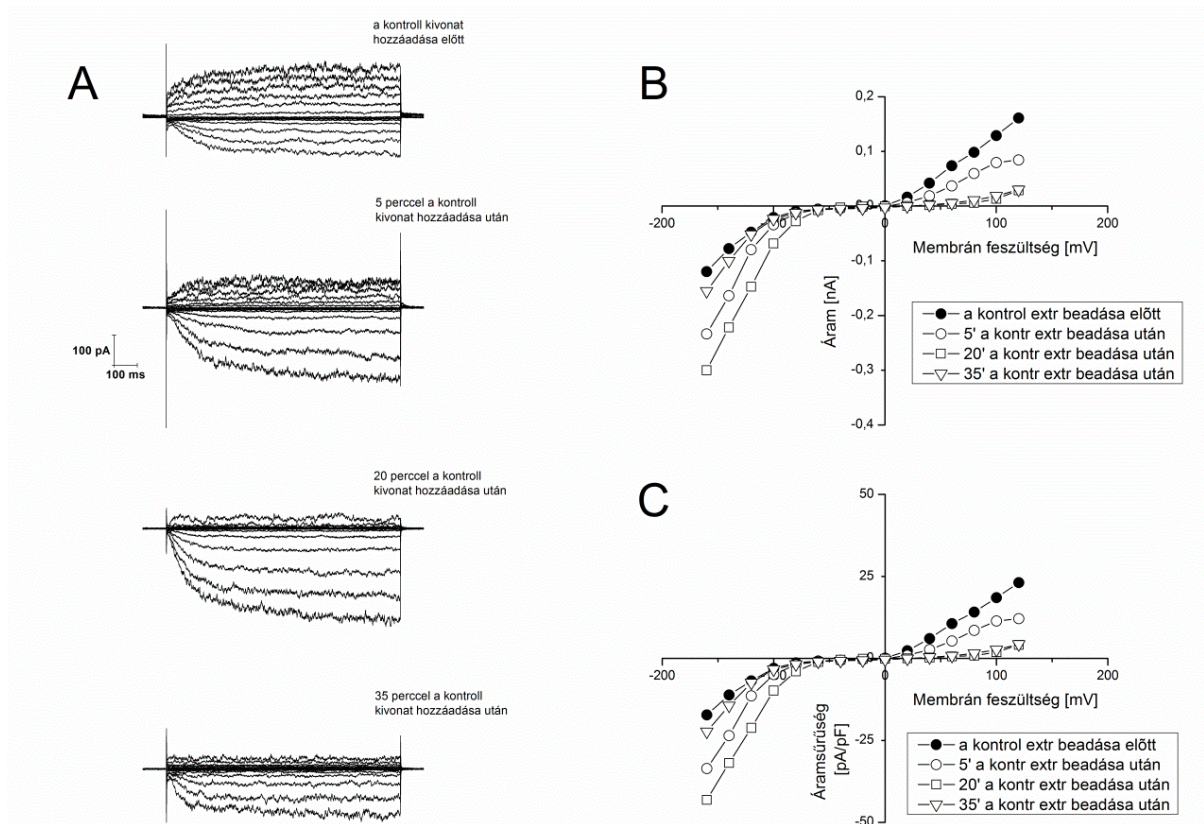
### **Fusarium fertőzött kukorica szemtermés kivonatok hatása a zárósejtek membrántranszport aktivitására: Patch clamp kísérletek**

A kísérletek előtt a különböző *Fusarium* törzsekkel (*F. graminearum* és *F. culmorum*) fertőzött kukorica szemeket megőröltük, majd 24 órán keresztül az extrakciós pufferben áztattuk őket. Az extrakciós puffer 84 % acetónitril és 16 % víz keverékéből állt. Az extrakciós puffer (2% v/v) zárósejtek membrántranszportjára gyakorolt lehetséges hatását kontroll kísérletekkel zártuk ki.

Ezekben azt tapasztaltuk, hogy a kifelé tartó kation áramok már 5 perc után gyors csökkenést mutatnak, amit a következő körülbelül 20-30 percet követően továbbra is megfigyelhetünk. A sejtek befelé tartó áramai 5 perc után enyhe csökkenést mutattak, ám később (20-30 perc elteltével) visszaálltak nagyjából a kiindulási értékekre.

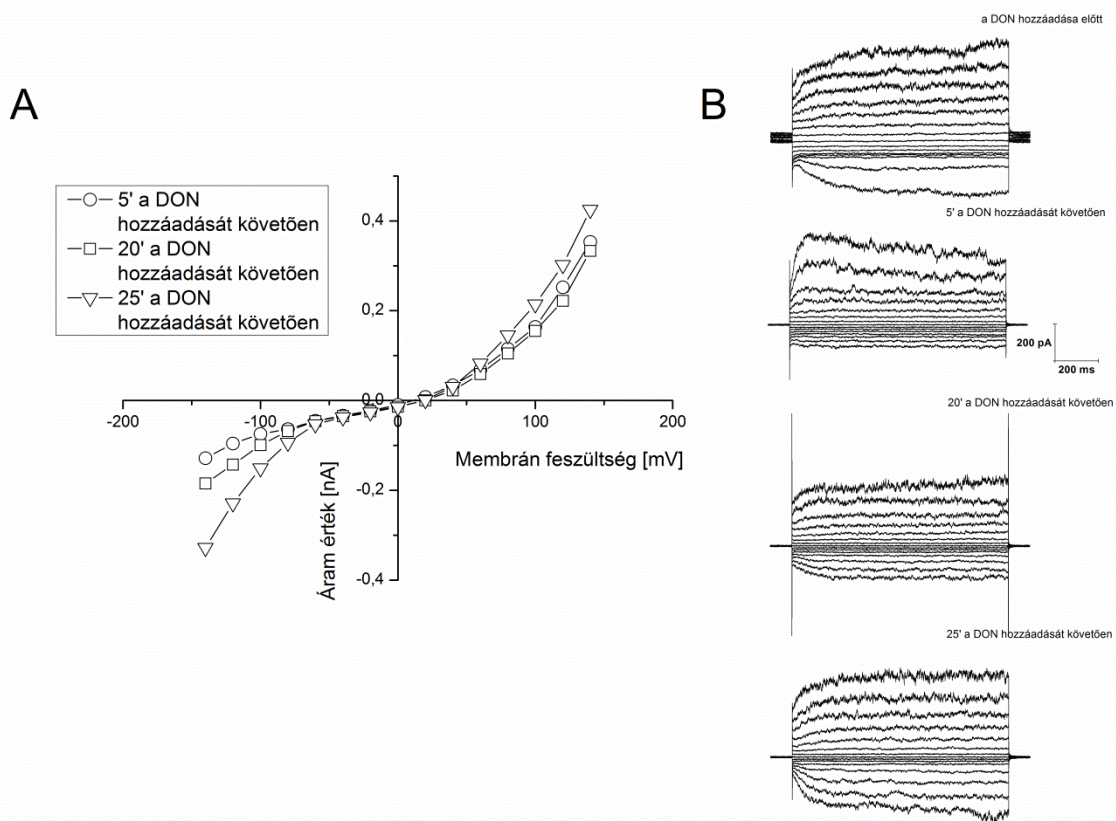
Mivel az extrakciós puffer esetében a mikotoxinokon kívül, számos egyéb anyag is kimosódhat, így további kontrollként megvizsgáltuk, hogy a nem-fertőzött kukoricaszemekből előállított izolátum vajon befolyásolja-e a zárósejtek teljes-sejtes ionáramait. A kifelé tartó áramok, az extrakciós pufferhez hasonlóan 5 percnél gyors csökkenést mutattak, amit 20-30 perccel később is megfigyelhetőek voltak. A befelé tartó

kation áramok viszont érdekesen viselkedtek, miszerint az első 20 percben megfigyelhető átmeneti emelkedést a 35. percre csökkenés váltotta fel. (10. ábra)



10. ábra A fertőzetlen kukorica kivonat hatása a zárósejtek teljes-sejtes áramaira. (A) A -80 mV tartó feszültségről indított -160 és +120 mV közötti 20 mV-os testfeszültség lépcsőkre adott áram válaszok a kivonat hozzáadása előtt és 5, 20 és 35 perccel a hozzáadását követően. A feltüntetett időpontokból származó steady state áramértékek a feszültség függvényében (B) ( $I/V$  görbék) és (C) az áramsűrűség (pA/pF) feszültség függvényében történő ábrázolása.

A különböző fertőzött kukorica kivonatok tesztelése előtt még egy ismert toxin a deoxinivalenol (DON) hatását is megvizsgáltuk, hogy a későbbiekben azonosítani tudjuk, mint a fertőzött kivonatok feltételezett fő toxinját. A kísérletekben 400 ng/ml koncentrációban alkalmaztunk DON-t, mely hatására egyedül a befelé tartó áramok növekedését tapasztaltuk, míg a kifelé tartó áramok nem változtak meg jelentősen.



11. ábra A DON hatása a zárósejtek teljes-sejtes áramaira.

A *Fusarium graminearum* fertőzött kukorica szemekből készített kivonat mind a kifelé-, mind pedig a befelé tartó áramokat lecsökkentte, melyek az idő előre haladtával sem álltak helyre. A *Fusarium culmorum* fertőzött kukorica szemekből készített kivonat esetében hasonló hatást tudtunk kimutatni (adatok nélkül).

## Összefoglalás

A különböző kezelések hatását az alábbi táblázatban foglaltuk össze:

Kezelés	Extrakciós puffer	Víz	400 ng/ml DON	Fertőztelen kivonat	<i>F. culmorum</i> és <i>F. graminearum</i> fertőzött kivonatok
Kifelé tartó áramok	gyors csökkenés, mi a következő 20-30 percben sem tud helyreállítani	nincs hatás	nincs hatás	gyors csökkenés, ami a következő 20-30 percben sem tud helyreállítani	csökkenés, helyreállítódás nélkül
Befelé tartó áramok	nincs hatás	nincs hatás	növekedik	gyors növekedés, majd visszatér a kiindulási értékre	csökkenés, helyreállítódás nélkül

A fenti eredmények alapján a következő következtetéseket vonhatjuk le:



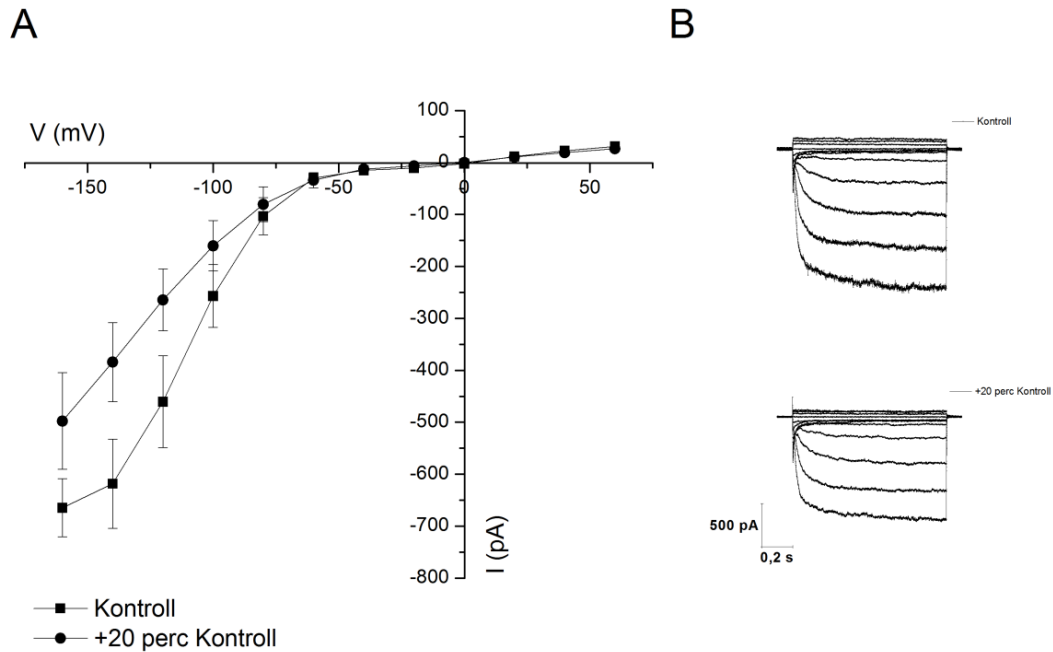
- A DON-kezelés csökkenti az acetonitril kifelé tartó áramokra gyakorolt hatását.
- A DON-kezelés növeli a befelé tartó kation áram értékét, ami hozzájárulhat a sztómányitódás elősegítéséhez.
- A fertőzetlen kivonat aktiválja a befelé tartó áramokat, melyek a 30. percre visszatérnek a kiindulási értékükre, azonban a fenti kísérletekből nem tudható pontosan, hogy a kivonatban jelen levő anyagok közül mely anyag hatására történnek ezen változások.
- A fertőzött kukoricaszemekből készített kivonatok (*F. culmorum* és *F. graminearum*) esetében a befelé tartó áramok erős gátlása figyelhető meg, mely a sztómányitódás gátlásához vagy a sztómazáródás indukálásához vezethet. A DON-nal végzett kísérletek alapján azonban kizárhatjuk a DON-t, mint mikotoxint, így a hatást feltehetően a kivonatban jelen levő elicitoroknak tudhatjuk be, melyek képesek a sztómamozgások fent említett befolyásolására.

### **Az ophiobolinok hatása a HEK 293-as heterológ expressziós rendszerben kifejeztetett KAT1 ioncsatornára**

Az ophiobolinok, azaz a *Helminthosporium* genus növénypatogén gombáinak fitotoxinjai esetében számos növényre gyakorolt hatást leírtak már. Ilyen például a növekedés gátló hatás, az apototikus folyamatok aktiválása, a protein és nukleinsav szintézis gátlás. Az ophiobolinok ismert kalmodulin antagonisták, rizsben gyökérnövekedés gátlást okoztak, a glükán- $\beta$ -1,3-szintetáz inhibitora, befolyásolja az elsődleges sejtfal kialakulását (a glikozil-1,3 kötések kialakításának befolyásolásán keresztül), csökkentik a fotoszintetikus CO<sub>2</sub> asszimilációját, befolyásolja a mitokondriális légzési láncot, aktiválják a PM-H<sup>+</sup>ATPáz működését, proton kiáramlást indukálva, befolyásolva a K<sup>+</sup> ionok felvételét, majd pedig ezáltal pedig sztómányitódást képesek indukálni.

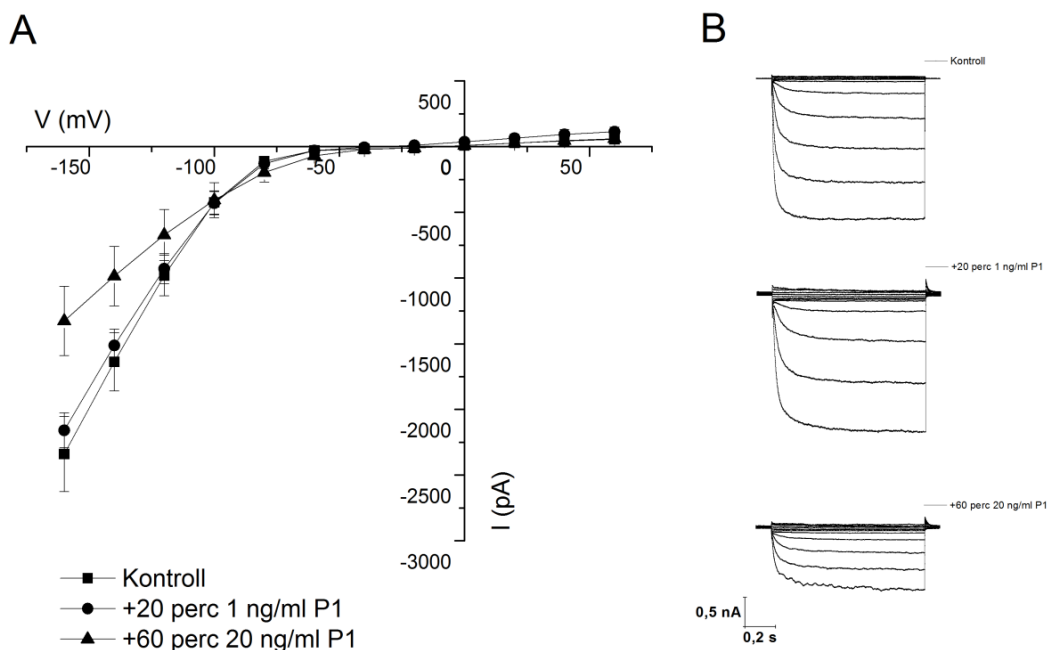
Kísérleteink során a zárósejtekben legjelentősebb befelé egyenirányító K<sup>+</sup> ioncsatorna, a KAT1 ophiobolinokra való érzékenységét vizsgáltuk meg. A KAT1 ioncsatorna heterológ expressziójához human embrió vesesejteket (HEK293) használtunk fel. A HEK293-as sejtek előnye a könnyű fenntarthatóság és transzfekció, valamint a patch clamp méréseknél fontos magas seal kialakítási sikeresség. A HEK293 sejteket az alacsony endogén csatornaaktivitás jellemzi, mely fontos szempont, hiszen a KAT1 HEK293 sejtben történő patch clamp vizsgálatakor az esetleges endogén háttéráramok nem volnának elkülöníthetők a KAT1 áramoktól, így a mérések pontatlanná válnának. A transzfekció során a pEGFP-N2-KAT1 (BD Biosciences, Clontech, USA) vektort jutattuk HEK293 sejtekbe, kationos lipid precipitációs technika segítségével, melyhez MetafecteneTm Pro reagenst (Biontex, Németország) használtunk.

Arra kerestük a választ, hogy vajon az idő múlásával változik-e a KAT1 ioncsatornán átfolyó ionáram erőssége. A 12. ábrán jól látható, hogy a vizsgálat kezdetét követő 20 percben jelentős befelé tartó kationáram csökkenést figyeltünk meg, mely az úgynevezett kimosódási effektussal magyarázható.



12. ábra A KAT1-HEK293 sejtek teljes sejtjes áramainak alakulása az idő függvényében.

A kontroll vizsgálatok befejezését követően négy opioid molekula (A, A1, A3, P1) tesztelését végeztük el. A kísérletek során a kontroll mérések után közvetlenül a sejtürdő oldathoz 1 ng/ml végkoncentrációban különböző opioidot adtunk, majd a hatást 20 perc elteltével teszteltük, ezután tovább növeltük a sejtürdő oldat opioid tartalmát egészen 20 ng/ml végkoncentrációig, majd a kísérlet kezdetétől számított 60. percen megmértük a kapott hatásokat. Az A, A1 és A3 opioid esetében nem tapasztaltunk szignifikáns csökkenést a kontroll méréseinkhez képest. A P1 esetében azonban 1 óra elteltével jelentős, szignifikáns csökkenést tudtunk kimutatni (13. ábra).



13. ábra Az opioid-P1 koncentráció- és időfüggő hatásának tesztelése KAT1-HEK293 sejtek teljes-sejtjes ionáramaira.

## Összefoglalás

A különböző ophiobolinok hatását a következő táblázatban foglaltuk össze:

Kezelés	KAT1 ionáram alakulása az idő függvényében	ophiobolin-A	ophiobolin-A1	ophiobolin-A3	ophiobolin-P1
Kifelé tartó áramok	folyamatos csökkenés	nincs hatás	nincs hatás	nincs hatás	60 perc elteltével csökkenés

Összességében kijelenthetjük, hogy az egyes ophiobolinok képesek voltak a kontroll sejtek esetében megfigyelhető kimosódási effektus meggátlására, egyes esetekben visszafordítására is, ami a KAT1 ioncsatorna ophiobolinokkal történő aktiválhatóságát bizonyítja. Az ophiobolinok ebből következően a PM-H<sup>+</sup>ATPáz működésének aktiválásán kívül a plazmamembrán befelé tartó K<sup>+</sup> ioncsatornáinak aktivitásának emelésével is hozzájárulhatnak a sztómányitódás kiváltásához.

### ***Irodalmi hivatkozás:***

- Abat JK, Deswal R (2009) 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* 9: 4368-4380
- Abat JK, Mattoo AK, Deswal R (2008) S-nitrosylated proteins of a medicinal CAM plant *Kalanchoe pinnata* - ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity targeted for inhibition. *Febs J* 275: 2862-2872
- Bilger W, Björkman O (1990) 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* 25: 173-185
- Boller T, Felix G (2009) A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60: 379-406
- Diner BA, Petrouleas V (1990) Formation by NO of nitrosyl adducts of redox components of the photosystem-II reaction center. 2. Evidence that  $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_2$  binds to the acceptor-side non-heme iron. *Biochim Biophys Acta* 1015: 141-149
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Stange A, Marten I, Bauer H, Ache P, Matschi S, Liese A, Al-Rasheid KA, Romeis T, Hedrich R (2009) Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21425-21430
- Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 990: 87-92
- Goussias C, Deligiannakis Y, Sanakis Y, Ioannidis N, Petrouleas V (2002) Probing subtle coordination changes in the iron-quinone complex of photosystem II during charge separation, by the use of NO. *Biochemistry-US* 41: 15212-15223
- Hu HH, Boisson-Dernier A, Israelsson-Nordstrom M, Bohmer M, Xue SW, Ries A, Godoski J, Kuhn JM, Schroeder JI (2010) Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO<sub>2</sub>-controlled stomatal movements in guard cells. *Nat Cell Biol* 12: 87-U234
- Jammes F, Song C, Shin D, Munemasa S, Takeda K, Gu D, Cho D, Lee S, Giordo R, Sritubtim S, Leonhardt N, Ellis BE, Murata Y, Kwak JM (2009) 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* 106: 20520-20525
- Jasid S, Simontacchi M, Bartoli CG, Puntarulo S (2006) Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins. *Plant Physiol* 142: 1246-1255
- Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiyama C, Dohmae N, Takio K, Minami E, Shibuya N (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 11086-11091
- Kitajima M, Butler WL (1975) Quenching of Chlorophyll Fluorescence and Primary Photochemistry in Chloroplasts by Dibromothymoquinone. *Biochim Biophys Acta* 376: 105-115
- Koers S, Deger AG, Marten I, Roelfsema MR (2011) Barley mildew and its elicitor chitosan promote closed stomata by stimulating guard cell S-type anion channels. *Plant J*
- Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T (1998) Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: Diaminofluoresceins. *Anal Chem* 70: 2446-2453



Kolla VA, Raghavendra AS (2007) Nitric oxide is a signaling intermediate during bicarbonate-induced stomatal closure in *Pisum sativum*. *Physiol Plantarum* 130: 91-98

Kolla VA, Vavasseur A, Raghavendra AS (2007) Hydrogen peroxide production is an early event during bicarbonate induced stomatal closure in abaxial epidermis of *Arabidopsis*. *Planta* 225: 1421-1429

Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards GE (2004) New fluorescence parameters for the determination of  $Q_A$  redox state and excitation energy fluxes. *Photosynth Res* 79: 209-218

Lawson T (2009) Guard cell photosynthesis and stomatal function. *New Phytol* 181: 13-34

Lindermayr C, Saalbach G, Durner J (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 137: 921-930

Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E (2009) Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. *Science* 324: 1064-1068

MacRobbie EAC (2000) ABA activates multiple  $Ca^{2+}$  fluxes in stomatal guard cells, triggering vacuolar  $K^+(Rb^+)$  release. *P Natl Acad Sci USA* 97: 12361-12368

Mawson BT (1993) Regulation of blue-light-induced proton pumping by *Vicia faba* L. guard-cell protoplasts: Energetic contributions by chloroplastic and mitochondrial activities. *Planta* 191: 293-301

Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126: 969-980

Michelet L, Zaffagnini M, Marchand C, Collin V, Decottignies P, Tsan P, Lancelin JM, Trost P, Miginiac-Maslow M, Noctor G, Lemaire SD (2005) Glutathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants. *P Natl Acad Sci USA* 102: 16478-16483

Millar AH, Day DA (1996) Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett* 398: 155-158

Mur LA, Mandon J, Persijn S, Cristescu SM, Moshkov IE, Novikova GV, Hall MA, Harren FJ, Hebelstrup KH, Gupta KJ (2013) Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB plants* 5: pls052

Mustilli AC, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J (2002) *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* 14: 3089-3099

Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot* 53: 1237-1247

Ordog A, Wodala B, Rozsavolgyi T, Tari I, Horvath F (2013) Regulation of guard cell photosynthetic electron transport by nitric oxide. *J Exp Bot* 64: 1357-1366

Oxborough K, Baker NR (1997) Resolving chlorophyll *a* fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components - calculation of  $qP$  and  $F_v'/F_m'$  without measuring  $F_o'$ . *Photosynth Res* 54: 135-142

Parvathi K, Raghavendra AS (1995) Bioenergetic processes in guard cells related to stomatal function. *Physiol Plantarum* 93: 146-154

Pei ZM, Kuchitsu K, Ward JM, Schwarz M, Schroeder JI (1997) Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in *Arabidopsis* wild-type and *abi1* and *abi2* mutants. *Plant Cell* 9: 409-423

Pel MJ, Pieterse CM (2013) Microbial recognition and evasion of host immunity. *J Exp Bot* 64: 1237-1248

Roelfsema MR, Levchenko V, Hedrich R (2004) ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels. *Plant J* 37: 578-588

Schreiber U, Schliwa U, Bilger W (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res* 10: 51-62

Shepherd R, Reader S, Falshaw A (1997) Chitosan functional properties. *Glycoconjugate J* 14: 535-542

Shibuya N, Minami E (2001) Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiol Mol Plant P* 59: 223-233

Shimazaki KI, Doi M, Assmann SM, Kinoshita T (2007) Light regulation of stomatal movement. *Annu Rev Plant Biol* 58: 219-247

Snyrychova I, Ayaydin F, Hideg E (2009) Detecting hydrogen peroxide in leaves in vivo - a comparison of methods. *Physiol Plantarum* 135: 1-18

Sokolovski S, Blatt MR (2004) Nitric oxide block of outward-rectifying K<sup>+</sup> channels indicates direct control by protein nitrosylation in guard cells. *Plant Physiol* 136: 4275-4284

Srivastava N, Gonugunta VK, Puli MR, Raghavendra AS (2009) 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* 229: 757-765

Suhita D, Raghavendra AS, Kwak JM, Vavasseur A (2004) Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiol* 134: 1536-1545

Takahashi S, Yamasaki H (2002) Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. *FEBS Lett* 512: 145-148

Talbott LD, Zeiger E (1993) Sugar and organic acid accumulation in guard cells of *Vicia faba* in response to red and blue light. *Plant Physiol* 102: 1163-1169

Vavasseur A, Raghavendra AS (2005) Guard cell metabolism and CO<sub>2</sub> sensing. *New Phytol* 165: 665-682

Wodala B, Deak Z, Vass I, Erdei L, Altorjay I, Horvath F (2008) In vivo target sites of nitric oxide in photosynthetic electron transport as studied by chlorophyll fluorescence in pea leaves. *Plant Physiol* 146: 1920-1927

Wodala B, Eitel G, Gyula TN, Ordog A, Horvath F (2012a) Monitoring moderate Cu and Cd toxicity by chlorophyll fluorescence and P-700 absorbance in pea leaves. *Photosynthetica* 50: 380-386

Wodala B, Ördög A, Ayaydin F, Bernula P, Horváth F (2012b) Investigating pathogen elicitor-induced stomatal responses in various plant species. 111th Croatian Biological Congress, Sibenik, p 177

Yang JD, Zhao HL, Zhang TH, Yun JF (2004) Effects of exogenous nitric oxide on photochemical activity of photosystem II in potato leaf tissue under non-stress condition. *Acta Bot Sin* 46: 1009-1014