

ZÁRÓJELENTÉS

PLASZTISZ-DIFFERENCIÁLÓDÁS: A SZERKEZET ÉS A MŰKÖDÉS ÖSSZEFÜGGÉSEI

T 038003 számú tematikus OTKA pályázat

2002-2005

(engedéllyel hosszabbítva 2006. augusztus 31-ig)

TARTALOMJEGYZÉK

- I. A kutatás általános tapasztalatai a munkaterv és a szerződés tükrében
- II. A kutatásban résztvevők értékelése, változások és indokaik
- III. SZAKMAI BESZÁMOLÓ
 - 1a. Összefoglalás, 1b. Summary
 2. Szervtenyészetek és szövettenyészetek kialakítása borsó csíranövényekből
 3. A szerv- és szövettenyészetekben fejlődő etioplasztiszok szerkezeti vizsgálata sötétben nevelt és megvilágított anyagokon
 - a) hormonhatások vizsgálata
 - b) δ -aminolevulinsav hatása
 - c) a táptalaj összetételének hatása
 - d) kalluszok vizsgálata
 4. Az etioplasztiszok finomszerkezetének vizsgálata
 - a) A háromdimenziós struktúra vizsgálata elektronmikroszkópos módszerekkel
 - b) A NADPH-protoklorofillid oxidoreduktáz szerkezetének és működésének vizsgálata nagynyomáson végzett fluoreszcencia spektroszkópai vizsgálatokkal
 - c) A NADPH-protoklorofillid oxidoreduktáz monomerje flash-fotoaktivitásának bizonyítása borsó epikotiljában
 - d) A NADPH-protoklorofillid oxidoreduktáz monomerjének aggregálódása glicerines-szaharózos közegben, e közeg szerkezetstabilizáló hatásának analízise
 - e) A monomer protoklorofillid formák dominanciájának következménye: lassú klorofill szintézis etiolált borsó epikotilban
 - f) Nehézfém (Hg) hatásának vizsgálata a prolamelláris test szerkezetére és a NADPH-protoklorofillid oxidoreduktáz összetevőire
 - g) Modellvizsgálat: a pigmentaggregáció és a fluoreszcencia spektroszkópai tulajdonságok közötti kapcsolatok tanulmányozása
 5. Etioplasztiszok, etio-kloroplasztiszok, átmeneti proplasztiszok, raktározásra módosult átmeneti proplasztiszok és etioplasztiszok leírása természetes körülmények között fejlődött virágzatokban, rügyekben, termésekben és raktározásra módosult szervekben
 - a) Természetes etiolált állapot a fejeskáposzta belsejében
 - b) Átmeneti etiolált állapot fás növények rügyeiben
 - c) Az átmeneti etiolált állapot részletes jellemzése vadgesztenye rügyeiben
 - d) Pigment és plasztisz formák természetes és in vitro burgonya gumókban és a természetes gumókon fejlődött hajtásokban
 6. A kiválasztásra differenciálódott plasztiszokat tartalmazó növények azonosítása, kiválasztószervük jellemzése fénymikroszkópiával, elektronmikroszkópiával, a termelt anyagok jellemzése
 7. Előkészítő, a munkatervben nem szereplő mérések különböző fénytől elzártan fejlődő nem levél szervekben
 8. Tervezett, de nem végrehajtott munkák:
 - Mikorrhizált növények előállítása, metabolizmusuk vizsgálata, fotoszintetikus apparátusuk jellemzése, mikorrhiza modell összeállítása, mikorrhizált és steril tenyészetek stressz-reakcióinak összehasonlítása
 - Elicitációs tényezők és elicitorok vizsgálata
 9. Következtetések: A NADPH-protoklorofillid oxidoreduktáz makrodóménjének szerkezeti modellje, összefüggés a monomerré, dimerre és oligomerré történő szerveződés valamint a fotoredukció hatékonysága illetve a fotooxidációs körülmények kialakulása között.
 - 10., A pályázati munkából készült publikációk (valamennyi esetben szerepel az OTKA megnevezése és a pályázat száma a cikk Acknowledgement-jében illetve a köszönetmondásban)
 - Impakt faktoralal rendelkező nemzetközi folyóiratokban publikált cikkek
 - Hazai folyóiratokban publikált cikkek
 - Nemzetközi konferenciákon történt részvétel (kiadvány)
 - Hazai konferenciákon történt részvétel (kiadvány)

I. A kutatás általános tapasztalatai a munkaterv és a szerződés tükrében

A pályázat munkatervének összeállításakor több célt is szem előtt tartottunk. A Tanszék összes tanárát bevonva a munkába igyekeztem kihasználni a Tanszék műszeres technikáját (pl. elektronmikroszkóp, spektrofluorométer) és hagyományokkal rendelkező kutatási módszereit (pl. szövet és szervtenyésztés), így a közös tudományos cél érdekében egy hatékony alkotóközösséget kialakítani. Az a tény, hogy sok olyan publikáció született, amelyekben korábban különböző témákban, különböző csoportokban dolgozó oktatók társszerzők lettek, bizonyítja e törekvés sikerét.

A pályázat munkatervének végrehajtását hátráltatta az, hogy a pénzügyi bizonytalanságok (késett kifizetések, elvonások) miatt nem lehetett minden részfeladatot végrehajtani. Ennek esett áldozatául a mikorrhizás téma, pontos ütemezés nélkül nem tudtunk belevágni a törzsek megrendelésébe, fenntartásába, a kultúrák kialakításába, hiszen nem tudhattuk előre pontosan az anyagi fedezet felhasználhatóságát. A szövet- és szervtenyészetek kutatása során is nagy nehézségekkel néztünk szembe. Egy tenyészet eljuttatása a kísérleti felhasználáshoz több hónapot vesz igénybe. A tenyésztési idő lejártá után viszont azonnal mérni kell, mert a többhónapos munka kárba vész a tenyészet elöregedése miatt. A pénzügyi problémák miatt többször át kellett terveznünk ezeket a kísérleteket, több tenyészetet pedig meg kellett semmisítenünk.

A sokféle módszer alkalmazása során egymás után derült ki a Tanszék eszközeiről, hogy elavultak, vagy karbantartásuk szükséges ahhoz, hogy a pályázatban kitűzött kísérleteket vagy azok kiértékelését el lehessen végezni. A váratlan szervizelési, alkatrész beszerzési költségek is áttervezéseket igényeltek. A futamidő alatt ilyen problémák miatt kértünk és kaptunk engedélyt arra, hogy az oktatók személyi keretét egyéb kategóriába sorolhassuk, így vegyszert, eszközt vehessünk vagy szervíz költségeket fizethessünk ki. Sajnálatos módon, a munka utolsó fázisában vált szükségessé pl. az elektronmikroszkóp nagyobb volumenű szervizelése és a metszetek készítéséhez szükséges gyémántkés köszörültetése, amit – tekintettel az ebben a témában történt fokozott igénybevételre – ebből a pályázatból kellett fedeznünk.

Mint témafelelős, csak köszönettel tartozhatok a munkában résztvevőknek, hogy a tudományos szempontokat figyelembe véve önzetlenül lemondtak a személyi kifizetésekről.

Összegzésképpen elmondható, hogy a hosszabb kísérleti idejű munkák csak akkor hajthatók végre, ha a szponzor pontos ütemezésben (és nem utólag) biztosítja a szerződésben meghatározott összegeket. Ha rendkívüli körülmények miatt a szponzor nem tudja a szerződésben meghatározott teljes összeget biztosítani, az elvonások miatti szerződésmódosítás tartalmazza azt a kitéletet is, hogy a csökkentett támogatás miatt a pályázónak legyen joga arányosan csökkenteni a munkatervben leírt feladatokat. (Egy ilyen munkaterv módosítás lehetőségét írásban kértem a szerződésmódosításhoz csatolt levelemben, amire nem érkezett válasz). További probléma a közbeszerzéshez való feltétlen ragaszkodás a pályázati pénzek felhasználása esetén is. Ez késlelteti a munkát, és nagyon sok esetben felesleges többletkiadást jelent, mert pl. nem tudunk megvenni egy olcsóbb eszközt, ha az szerepel a közbeszerzési listán.

Ezek a megállapítások nem az OTKA Irodának, hanem a magasabb szintű pénzügyi szerveknek szólnak.

II. A kutatásban résztvevők értékelése, változások és indokaik

A pályázat 4 éve során néhány személyi változás történt az eredeti szerződésben leírt nevekhez képest, ezekről a részjelentésekben beszámoltunk.

A pályázatban valamennyi oktató végrehajtotta a vállalt feladatát. A mikorrhiza téma kiesése miatt Jakucs Erzsébet docens nem végzett kísérletes munkát e pályázat keretében, és a szintén mikológiai témát vállaló Szedlay Gyöngyi adjunktus is csak a szövettenyésztéshez szükséges irodalmi kutatást segítette, illetve több számítógépes kiértékelési feladatot látott el.

A pályázati munkához csatlakozott Solymosi Katalin, aki korábban szakdolgozatosom, majd PhD hallgatóm volt, ezután pedig egyetemi tanársegédi kinevezést kapott. Mivel közvetlenül az én kutatócsoportomban dolgozik, a pályázat megvalósításában alapvető szerepet játszott. Szintén bekapcsolódott a pályázat kísérletes feladatainak végrehajtásába Vági Pál, 1 éven keresztül mint PhD hallgató, utána pedig tudományos segédmunkatársként.

2002-2003-ban Lenti Katalin doktoranduszként dolgozott egyes részfeladatokban.

2003-tól 2005 júliusáig szakdolgozatosként, 2005. augusztusától pedig doktoranduszként Kósa Annamária és Szenzenstein Andrea is résztvett a pályázat munkáiban. Mindketten színvonalas anyagot mutattak be az ELTE TTK kari és az Országos Tudományos Diákköri Konferencián. Kósa Annamária ez utóbbin első helyezést kapott, sőt a biológus szekció legjobb munkájának megítélt különdíjat is elnyerte.

A doktoranduszok mellett mindegyik évben szakdolgozatos hallgatók is bekapcsolódtak a munkába: évente 5-10 hallgató végez szaklaboros munkát ebben a témában.

A doktoranduszok és a szakdolgozatosok munkáját tekintve ez az OTKA pályázat hozzájárult egy kisebb „iskola” kialakításához, amely lehetőséget ad a biológus és biológia-tanár szakos hallgatók számára ahhoz, hogy bekapcsolódhassanak a tudományos munkába.

A pályázat témája hazai és nemzetközi együttműködésben folytatott kutatásokhoz szorosan kapcsolódik. Ennek következtében hazai és külföldi együttműködő partnerek is résztvettek egyes feladatok megoldásában:

1, Számos fontos alapkutatási kérdés megoldásában kaptunk segítséget a **Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetétől**. **Fidy Judit** professzor és az általa irányított Lézerspektroszkópai Laboratórium lehetőséget adott speciális spektroszkópai mérések elvégzésére, amelyekből több közös publikáció született.

2, Több kérdés megoldásában jelentős segítséget kaptunk az **MTA Szegedi Biológiai Központja Növénybiológiai Intézetétől: Hideg Évától** és munkatársaitól.

3, 1980 óta van együttműködésem a **Göteborgi Tudományegyetem (Svédország)** kutatóival: **Christer Sundqvist** professzorral, **Margareta Ryberg**gel és több más munkatársukkal. Több, a pályázat témakörében készített közös publikáció mutatja ennek az együttműködésnek a hasznosságát. Ezeknek az együttműködéseknek köszönhetően 2005 decemberében a Svéd Királyi Tudományos és Művészeti Társaság külföldi tagjává választottak Göteborgban.

4, Szintén hagyományosan jó együttműködésünk van a **Liègei Tudományegyetemmel (Belgium)** a NADPH protoklorofillid oxidoreduktáz enzim kutatásában. **Fabrice Franck** és csoportja is bekapcsolódott a pályázat keretébe tartozó munkákba is, növelve ezzel a munka színvonalát.

5, A pályázat futamideje alatt kezdtünk együttműködni a **Krakkói Jagelló Egyetem (Lengyelország)** Növényélettani és Növénybiokémiai Tanszékével: *Kazimierz Strzalka* és *Beata Mysliwa-Kurdziel* kapcsolódott be a munkánkba.

III. SZAKMAI BESZÁMOLÓ

1a. Összefoglalás

Munkánkban a plasztisz-differenciálódás folyamatában vizsgáltuk a struktúra és a funkció közötti összefüggéseket különböző szerveződési szinteken. Kísérleteinkben laboratóriumi körülmények között nevelt csíranövényeket, szerv- és szövettenyészetet, szövet-homogenátumokat, membrán-preparátumokat, intakt növényeket és a természetből begyűjtött rügyeket és egyéb növényi szerveget használtunk. A differenciálódás folyamatának indikátoraként a protoklorofillid – klorofillid átalakulást irányító NADPH:protoklorofillid oxidoreduktáz (POR) enzim különböző makrodoménjeit, illetve a pigmentek komplexeit használtuk. 77 K-n, 10 K-n és szobahőmérsékleten végzett fluoreszcencia spektroszkópiát valamint nagynyomású spektroszkópiát alkalmaztunk. A spektroszkópiai módszerekkel kiválasztott mintákon elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztünk. Megállapítottuk, hogy a POR monomer, dimer és oligomer komplexei valamennyien flash fotoaktívak, ha az alegységeiben protoklorofillid és NADPH jelen van. A POR komplexek dinamikusan, pár másodperc alatt egymásba tudnak alakulni a fototranszformáció folyamatában. A monomer POR mellett mindig jelentős mennyiségű, nem az aktív központban kötött pigment található, és NADPH hiány is jellemző. Ennek következtében a monomer dominanciájú szervek természetes fényen fotodegradálódnak. A makrodomén szerveződés növeli a protoklorofillid fotoredukciójának hatékonyságát, a $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ciklikus átalakulásaival protoklorofillid és klorofillid mikrociklusok működnek, ami szintén a fotodegradáció ellen véd. A makrodomén szerveződés együtt jár a prolamelláris test kialakulásával, fejlett etioplasztiszok képződésével. A nem levél eredetű szervekben gyakran csak protilakoidokkal rendelkező, proplasztisz jellegű etioplasztiszok vannak, amelyekben a POR és pigment monomerek dominálnak. A plasztisz fejlettségi állapotát a citokinin hormonszint és a N-ellátottság szabályozza. Proplasztiszok, etioplasztiszok legalább átmeneti fejlődési állapotban természetes körülmények között is megtalálhatók olyan szövetekben, szervekben, amelyek fénytől elzártan, például burkoló- vagy pikkelylevelek alatt differenciálódnak. Raktározó szervekből sötétben hajtattással etiolált szövetek fejleszthetők, ezekben számos átmeneti állapotú plasztiszt mutattunk ki. Ezekben klorofill és protoklorofillid, valamint tilakoid membránok és etioplasztisz belső membránok együttesen is előfordulnak, valamint gyakori a keményítő felhalmozódása. A kiválasztásra differenciálódott skizogén járatok epitél sejtjeiben és egyes mirigyszőrökben a kloroplasztisz a fotoszintetikus aktivitását elvesztve kiválasztásra tud módosulni.

Eredményeink alapján a szakirodalomban a klorofill bioszintézis befejező lépését leíró reakciósémákat ki kell egészíteni és módosítani kell. Hasonló kiegészítésre van szükség a plasztisz-differenciálódási folyamatokat taglaló reakciósémákban is.

Eredményeink új kutatási kérdéseket vetnek fel, amely indokoltá teszi e munka folytatását, ehhez sok előkísérletet végeztünk.

Befejezett munkáinkat számos nemzetközi folyóiratban, nemzetközi és hazai konferenciákon mutattuk be, és témája volt számos diákköri pályamunkának, szakdolgozatnak és PhD doktori értekezéseknek.

1b. Summary

Relationships between the structure and function were studied in the process of plastid differentiation, on different organizational levels. Seedlings grown under laboratory conditions, organ- and tissue cultures, tissue homogenates, membrane preparations, intact plants as well as buds and other organs collected from the nature were used in the experiments. Different macrodomains of the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase (POR) enzyme and pigment complexes were used as indicators of the differentiation process. Fluorescence spectroscopy with measurements at 77 K, 10 K and room temperature, as well as at high pressure has been employed. On samples selected with spectroscopic methods, electron microscopy studies were done. We have proved that all of the monomer, dimer and oligomer complexes of POR are flash-photoactive if its subunits contain both, protochlorophyllide and NADPH. The complexes of POR can transform into each other within a few seconds during the process of phototransformation. Together with the POR monomer a significant amount of pigment is present, which is not bound to the active site; and also the shortage in NADPH is a characteristic feature of these samples. As a consequence, organs with the dominance of monomers suffer photodegradation at natural light conditions. The macrodomain organization increases the efficiency of protochlorophyllide photoreduction; the cyclic $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ conversion ensures protochlorophyllide and chlorophyllide micro-cycles, which provides protection against photodegradation, too. The macrodomain organization proceeds together with the formation of prolamellar bodies, i.e. of developed etioplasts. In non-leaf organs, often proplastid type etioplasts with only prothylakoids can be found. In these plastids, the monomers of POR and of the pigments are dominant. The developmental stage of plastids is regulated by cytokinin hormon concentration as well as by the nitrogen supply. Proplastids, etioplasts can be found at least in transitional developmental stages in the nature in tissues or organs which develop under shaded conditions, for example under scale leaves. Etiolated tissues can be forced from storage organs in the dark. A number of plastids in transitional developmental stages were detected in these tissues in which chlorophyll and protochlorophyllide, as well as thylakoid membranes and etioplast inner membranes are present simultaneously. Starch accumulation is also common. In the epithel cells of schizogene cavities, differentiated for secretion and in certain glandular hairs, the chloroplast loose their photosynthetic activities and modify for secretion.

On the basis of our results, the reaction schemes in the literature describing the terminal steps of chlorophyll biosynthesis should be completed and modified. Similar amendments are needed in schemes explaining plastid differentiation processes.

Our results bring up new research questions, which make reasonable the continuation of this work. A series of preliminary experiments were carried out for this. The completed works have been published in numerous international journals, were shown at international and Hungarian conferences and were subjects of works in the scientific student club competitions, diplomas and PhD theses.

2. Szervtenyészetek és szövettenyészetek kialakítása borsó csíranövényekből

A tenyészetek kialakítására többféle tápközeget próbáltunk ki. A Murashige-Skoog tápközeget alkalmasnak bizonyult arra, hogy a kísérletekhez szükséges növénykéek fejlődjenek, a Linsmaier-Skoog tápközegen viszont kalluszokat alakítottunk ki. A magból kimetszett csíra és hozzá kapcsolódó kisméretű szikleveél darabból olyan növénykéek fejlődtek ki, amelyeknek a kényszer-kalluszán több oldalhajtás is nőtt. Így genetikailag azonos „paralell” mintákat kaptunk. Ezeket a növénykéeket feldarabolva új tápközegbe vittük át, és a következő 2-3 hónapos periódusban sötétben neveltük.

3. A szerv- és szövettenyészetekben fejlődő etioplasztiszok szerkezeti vizsgálata sötétben nevelt és megvilágított anyagokon

3.a) Hormonhatások vizsgálata

A Murashige-Skoog tápközeget sok citokinin jellegű hormont is tartalmazott. Az elektronmikroszkópos és a fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatok azt igazolták, hogy a citokinin jelenléte miatt a sötétben nevelt növények szárában olyan etioplasztiszok alakultak ki, amelyeket eddig csak etiolált levelekben figyeltek meg: az etioplasztiszokban jól fejlett prolamelláris testek fejlődtek, amelyekben a 655 nm-nél fluoreszkáló NADPH-protoklorofillid oxidoreduktáz enzim alegységeinek oligomerje (P655) dominált. A citokinin hatását bizonyították azok a kísérletek, amelyekben csökkentettük a citokinin mennyiségét, ennek következtében arányosan csökkent a P655 aránya, mennyisége. Az elektronmikroszkópos képeken kevésbé strukturált etioplasztiszok láthatók.

3.b) δ -aminolevulinsav hatása

Felmerült a kérdés, hogy mi okozza az etioplasztiszok szövet-, illetve szervspecifikus fejlődését. A fenti kísérlet bizonyította, hogy hormonhatások mindenképpen befolyásolják ezt a folyamatot. További kérdésként merült fel, hogy a pigment-tartalom mesterséges megnövelése hogyan hat a pigment-protein komplexek, ezen keresztül az etioplasztisz belső membránok kialakulására. Elméletileg feltételezhető ugyanis, hogy a pigmentek és az egyéb membránalkotók bioszintézisének regulációja összehangolt. Erre a kérdésre sötétben nevelt csíranövények epikotiljának δ -aminolevulinsav kezelésével és szövettenyészetekben kapott szárossal történő összehasonlításával próbáltunk választ kapni. A kezelés hatására kétháromszoros értékre növekedett az epikotilok átlagos protoklorofillid tartalma, viszont megállapítottuk, hogy e pigment-tartalom növekedés önmagában nem elegendő az epikotilok etioplasztiszokban a prolamelláris testek kialakulásához és a P655 felhalmozásához. Tehát a citokinin hatásának sokkal nagyobb ebben a kérdésben a jelentősége.

3.c) A táptalaj összetételének hatása

Változtattuk a tápközeget N-forrását: N-t egyáltalán nem tartalmazó tápközeget és a teljes tápközeget között több különböző N-tartalmú tápközegen tenyésztettünk borsó növénykéket. A nitrogénhiányos állapot a borsó esetében érdekes eredményeket ígért, mivel ez a növény természetes körülmények között a N-kötő baktériumokkal való szimbiózis miatt nem kerül nitrogénhiányos állapotba. A N-hiány hatására sötétben nevelt tenyészetekben csökkent a hajtások mérete. Ezzel együtt az etioplasztiszok mérete, strukturáltsága fokozatosan csökkent,

szintén csökkent a P655 mennyisége, aránya a kisebb komplexekhez illetve a monomer enzim-alegységekhez viszonyítva.

d) Kalluszok vizsgálata

Kalluszosító tápközégek [LS (Linsmaier-Skoog) és MS (Murashige-Skoog) táptalajok 5 mg/l 2-4-D-vel kiegészítve] hatását is tanulmányoztuk, illetve összehasonlítottuk a kalluszokban található etioplasztiszok szerkezetét, az egyes pigmentformákat a teljes tápközegen, sötétben nevelt növénykéék kényszer-kalluszaiban található etioplasztiszokéval és pigmentformákkal. A sötétben nevelt kalluszokban valamennyi esetben ki lehetett mutatni a protoklorofillid jelenlétét, de csaknem teljes mértékben monomer állapotban. A 630 nm-nél emittáló protoklorofillid forma mellett kis mennyiségben 636 és 644 nm-nél emittáló formákat is kimutattunk. Ez utóbbiak fotoaktívnak bizonyultak: 30 sec gyenge fényvel történő megvilágítás hatására 676 nm-nél jelent meg új emissziós sáv, ami a klorofillid keletkezését bizonyítja. Ezekben a mintákban proplasztisz jellegű plasztiszok alakultak ki.

A kalluszok természetes fényre történő átvitelük következtében kifehéredtek (bleaching), azaz pigmentjeik foto-oxidálódtak, majd a kalluszok megbarnultak. A kalluszok zöldülését, vagyis klorofill kismértékű felhalmozását figyeltük meg, ha a kalluszokat alacsony fényintenzitáson neveltük. Az LS táptalajon nevelt kalluszok például mintegy 25 nap alatt megzöldültek 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ fényintenzitáson, fluoreszcencia emissziós spektrumukban 684, 694 és 733 nm-nél találtunk emissziós sávot. Ezek a zöld növényekre jellemző klorofill-protein komplexek sávjai, együttes megjelenésük a teljesen kiépült fotokémiai rendszerek jelenlétét mutatja.

A szervtenyészetek alkalmasnak bizonyultak lényeges alapjelenségek vizsgálatára, viszont sok módszertani problémát is felvetettek. (Például ugyanabban a tenyész-edényben nagyon különböző növénykéék alakultak ki.)

E munkák eredményeinek egy részét a 2006. június 22-23-án megrendezett XII. Magyar Növényanatómiai Szimpóziumon mutattuk be, több kézirat elkészítése folyamatban van:

Kósa Annamária, Preininger Éva és Böddi Béla (2006): Különböző mértékű nitrogénhiány hatása szervtenyészetben fejlődött borsó (Pisum sativum L.) száruk etioplasztiszainak fejlődésére. In: XII. Magyar Növényanatómiai Szimpózium ed.: Mihalik Erzsébet pp. 84-88.

JATE Press, ISBN: 963 482 767 5

4. Az etioplasztiszok finomszerkezetének vizsgálata

4.a) A háromdimenziós struktúra vizsgálata elektronmikroszkópos módszerekkel

A Tanszékünkön folyó elektronmikroszkópos kutatások egyik irányvonala a háromdimenziós képalkotás. A pályázat keretében Kristóf Zoltán docens irányításával Tóth Szabolcs hallgató tudományos diákköri és szakdolgozati munkájában elektrontomográfias módszert dolgozott ki a prolamelláris test membránszerkezetének tanulmányozására. A kiindulási elektronmikroszkópos vetületi képekből háromdimenziós mátrixot képeznek számítógépesen. A mátrix pontjait a kép denzitási értékei adják. A mátrix tömböt ezután bármely irányban virtuálisan el metszhetjük, sorozatmetszetet készíthetünk. A sorozatmetszeten a megfelelő kontúrokat kijelölve egy háromdimenziós modell állítható össze, amely megjeleníti az általunk kiválasztott határfelületeket. Ezzel a prolamelláris test membránjai lefutásának térbeli rekonstrukciója valósítható meg. Ehhez a munkához a

Tanszéken meglévő Hitachi 7100 transzmissziós elektronmikroszkópot használtuk, amelyben egy -60 foktól $+60$ fok forgatási szög tartománnyal rendelkező goniométert alkalmaztunk. Maximálisan 500 nm-es rétegvastagságú metszeteken 125 kV gyorsítófeszültség mellett a goniométert kétfokként forgatva 51-61 képet készítettünk. Egy CCD kamera segítségével 1376 x 1032 pixeles felbontással 16 bit mélységgel készítettük az egyenként 1.35 MB méretű képeket. 61 kép esetén ez 82.35 MB adatmennyiséget jelentett, aminek a feldolgozására a továbbiakban egy IMOD (3.1.0) szoftvert használtunk. A kísérletekhez 8 napos etiolált kukorica leveleket használtunk. A kísérletek során sikerült számos technikai problémát megoldanunk, így lehetővé válik, hogy a munka folytatásaként nyomon tudjuk követni a prolamelláris test membránjainak megvilágítás hatására történő átalakulását. Ez a membránlipidek köbös fázisból lamelláris fázisba történő átmenetével és a prolamelláris test fokozatos és teljes szétesésével jár együtt. Közben a POR enzim oligomer struktúrája is megszűnik, monomer enzim alegységek szabadulnak fel, majd proteázok működése következtében lebomlik.

A munka folytatásával lehetőségünk lesz arra, hogy összekössük a membránokat felépítő nagy egységek átalakulásait a molekuláris változásokat tükröző spektrális átalakulásokkal.

Ezeket az eredményeket egy szakdolgozat tartalmazza, és előadást tartottunk belőlük a Magyar Mikroszkópos Társaság 2004. évi konferenciáján. Önmagukban viszont nem elegendők színvonalas, nemzetközi folyóiratban történő publikálásra. A fenti, fény hatására történő változások leírásával kiegészítve azonban rangos folyóiratban publikálható kézirat készíthető, erre az elektronmikroszkóppal felmerülő technikai problémák miatt 2006 végén, 2007 első félévében kerülhet sor.

Tóth Szabolcs, Imre Kornél, Vági Pál, Solymosi Katalin, Böddi Béla, Kristóf Zoltán Plasztiszok membránrendszerének tomográfias vizsgálata Magyar Mikroszkópos Társaság Konferenciája, Balatonalmádi, 2004. 05. 27-29. (előadás, Tóth Szabolcs)

4.b) A NADPH-protoklorofillid oxidoreduktáz szerkezetének és működésének vizsgálata nagynyomáson végzett fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatokkal

A Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézete Lézerspektroszkópiai Laboratóriumával együttműködésben a klorofill bioszintézis kutatások témakörében elsőként alkalmaztunk nagynyomáson végzett fluoreszcencia spektroszkópiai méréseket. A módszer különlegessége, hogy a mintákra a légköri nyomás több százszoros vagy ezerszeres értékét adva befolyásolni lehet az olyan enzimreakciók sebességét, amelyek térfogatváltozással mennek végbe. A határ-nyomásértékek megállapításával ki lehet számítani az aktivációs térfogatot, amelyből az enzim aktív centrumának szerkezetére is lehet következtetni, illetve a reakció típusáról lehet információt szerezni. Az enzimkinetikai paraméterek kiszámításával pedig a reakció lefutásáról, intermedierek megjelenéséről, párhuzamos reakciók futásáról kaphatunk információt.

E pályázat előzményeként meghatároztuk a NADPH:protoklorofillid oxidoreduktáz (POR) enzim aktiválási térfogatát, és megállapítottuk, hogy a protoklorofillid fotoredukciója során az aktív központ mintegy 3 \AA^3 térfogatváltozáson megy keresztül. Ebben a pályázatban a fotoredukciót követő bonyolult reakciófolyamatokat analizáltuk. Az ezt mutató spektrális változások komplex volta miatt a folyamat leírása máig vitatott kérdésnek számít. A megvilágítást követően pár másodpercig 688, ezután 696 nm-nél jelenik meg fluoreszcencia emissziós maximum. Ezután természetes körülmények között 20-30 perc alatt a maximum 680 nm-re tolódik el. Ezt a változást „Shibata-shift”-nek nevezzük. A spektrális eltolódással

együtt a prolamelláris test szétesését, a klorofillid fitolizációját (klorofill-a-vá történő továbbalakulását) figyelték meg. Korábbi eredményeinkkel összhangban a nagynyomáson végzett mérések alapján a következő reakciósorozatot feltételezhetjük. A fotoredukciót végrehajtó POR enzim alegységei oligomerekbe rendeződve a szubsztrát protoklorofillid molekulákat aggregátumokba rendezik. A reakció végbemenetele után klorofillid aggregátumok keletkeznek. Ezt követően membránátalakulások indulnak el: a prolamelláris test köbös fázisú lipidszerkezete lamelláris fázisba alakul át. Ezzel párhuzamosan a POR alegységek eltávolodnak egymástól, a klorofillid aggregátumok dezaggregálódnak és kiszabadulnak a POR aktív központjából. Így monomerként kötődni tudnak a klorofill szintáz aktív központjában és végbemehet a klorofillid - klorofill-a átalakulás. További érdekessége a reakciónak, hogy párhuzamosan több reakció is végbemegy: az ebben a munkában vizsgált búza levélhomogénátumokban a kinetikai paraméterek a POR dimerek és POR oligomerek párhuzamos reakcióit valamint mindegyik úton intermedierek kialakulását mutatták. További érdekesség, hogy az irodalomból ismert „klorofillid mikrociklus” is lejátszódik: a protoklorofillid-klorofillid átalakuláshoz szükséges protonok egy részét ugyanis NADPH biztosítja. A koenzim oxidációja után fennmaradó pozitív töltés befolyásolja az enzimreakció korai termékének spektrális tulajdonságait, így egy kb. 30 sec életidejű átmeneti forma (688 nm-es maximum) alakul ki. Ez a forma ezt követően eltűnik, mert a NADP^+ vissza-redukálódik és kialakul a 696 nm-es forma, amiből a Shibata-shift folyamatai indulnak el.

László Smeller, Katalin Solymosi, Judit Fidy, Béla Böddi (2003) Activation parameters of the blue shift (Shibata shift) subsequent to protochlorophyllide phototransformation. Biochimica Biophysica Acta – Proteins and Proteomics 1651, 130-138

A svéd együttműködő partnereket is bevonva a munkába a fenti kinetikai analíziseket elvégeztük etiolált búza levelek etioplasztiszaiából izolált és tisztított prolamelláris test preparátumokon és protilakoidban gazdag membránfrakciókon is. A tisztított membránfrakciókon végzett mérések pontosították a fenti reakciók leírását. Részletes analízist végeztünk különböző hőmérsékleteken és nyomásértékeken a reakcióparaméterek precízebb leírása érdekében.

E munkák eredményeiből a kézirat elkészült, jelenleg a svéd partnereknél van. Előreláthatóan szeptemberben küldjük be a Biochimica et Biophysica Acta folyóirathoz.

Az ebben a szakaszban leírtak adták Solymosi Katalin doktori értekezése eredményeinek egy részét:

Solymosi Katalin: A NADPH:protoklorofillid oxidoreduktáz enzim felhalmozódása természetes körülmények között és működésének analízise in vitro. Doktori értekezés ELTE, 2004.

4.c) A NADPH-protoklorofillid oxidoreduktáz monomerje flash-fotoaktivitásának bizonyítása borsó epikotiljában

A klorofill bioszintézisében a protoklorofillid-klorofillid átalakulás egyik ellentmondása volt, hogy a reakciót katalizáló NADPH:protoklorofillid oxidoreduktáz (POR) enzimnek csak a dimer és oligomer egységeiről mutatták ki, hogy közvetlen fotoaktivitása van. Ez azt jelenti, hogy a dimer és oligomer egységekben egyetlen flash (1-2 ms felvillanás) hatására végbemegy a fenti reakció, ráadásul a reakció hőmérséklet-függése speciális. A reakció alacsony hőmérsékleten, még -80 C° -on is végbemegy, a V_{max} érték -14 C° -on van. Annak ellenére, hogy a növényekben a POR alegységek monomerjei is jelen vannak, azaz a

POR-enzim monomerje, monomer protoklorofillid és NADPH alkotta hármas komplex ad egy-egy egységet, ezt a monomert nem tekintették fotoaktívnak. Szerepét csak a dimer és oligomer POR aggregátumok regenerációjában jelölték meg.

A pályázat nagyrészt vizsgált etiolált borsó epikotil alkalmasnak bizonyult arra, hogy kimutathassuk a POR monomer közvetlen flash-fotoaktivitását is. Ebben a szervben ugyanis csak fejletlen etioplasztiszok vannak, amelyekben a POR mennyisége kicsi, az etioplasztisz belső membránok csak kevéssé szerveződnek prolamelláris testekbe és a POR többsége csak monomer állapotban van jelen (636 nm-es fluoreszcencia emissziós maximummal).

A monomer POR alegység (P636) elkülönített átalakítását 632.8 nm-es fényt adó lézerrel növeltük, mivel a P636 abszorpciós maximuma 633 nm-nél van. A megvilágítás hosszát, intenzitását és a megvilágított minta hőmérsékletét is változtattuk. Bebizonyítottuk, hogy a monomer P636 közvetlenül monomer klorofilliddé (C678) alakul át. A különböző körülmények között végzett megvilágítás során szép bizonyítékokat kaptunk a különböző protoklorofillid komplexek dinamikus átalakulására is, ami a membrán-dinamizmusok következtében a megvilágítás közben, akár 100 msec alatt is végbemegy. Tehát a P636 dimerré (P644) vagy oligomerré (P655) alakul át. Ennek következtében a protoklorofillid fotoredukciója minimum három párhuzamos reakcióúton valósul meg. Mindegyik úton intermedierek is létrejönnek, és a termék klorofillid formák is egymásba tudnak alakulni. Ezeknek az eredményeknek a tükrében a protoklorofillid fotoredukcióját leíró tankönyvi sémákat módosítani kell. Lényeges megemlíteni ugyanakkor, hogy a P636-nak csak egy része flash-fotoaktív. Ennek okára egy későbbi vizsgálatunk („e” pontban) ad magyarázatot.

A. Kósa, Zs. Márton and B. Böddi (2005) Fast phototransformation of the 636 nm emitting protochlorophyllide form in epicotyls of dark-grown pea (Pisum sativum L.) Physiologia Plantarum 124, 132-142

4.d) A NADPH-protoklorofillid oxidoreduktáz monomerjének aggregálódása glicerineszaharózos közegben, e közeg szerkezetstabilizáló hatásának analízise

A borsó epikotil vizsgálata során kimutatott 636 nm-nél emittáló protoklorofillid formáról csak feltételezni lehetett, hogy az a NADPH-protoklorofillid oxidoreduktáz (POR) monomerje. Erre közvetlen bizonyítékot szolgáltatott azok a kísérleteink, amelyekben a sötétben nevelt borsó csíranövények epikotilját 50 % (V/V) glicerint és 50 % (m/V) szaharózt tartalmazó foszfát pufferben homogenizáltuk. Ha ezt a homogenátumot -16 C°-on sötétben inkubáltuk, pár nap alatt megnőtt a 655 nm-es emissziós sáv, a 636 nm-es sáv intenzitása pedig csökkent. Ugyanezt a hatást értük el, ha a homogenátumot több ciklusban, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd 20 C°-ra melegítettük fel. Különösen hatékony volt, ha a 4 napig -16 C°-on inkubált mintákkal végeztük el a fagyasztás-felmelegítés ciklusokat. Ugyanezek a kezelések a 655 nm-es sáv csökkenését illetve eltűnését okozták intakt epikotil darabok esetében. A keletkezett 655 nm-es protoklorofillid forma (P655) teljes flash-fotoaktivitást mutatott, így a flash-megvilágításra képződő klorofillid mennyisége több mint kétszeresére nőtt.

Szilárdtest fizikai és fizikai kémiai kutatások eredményeivel történő összehasonlítások alapján arra következtettünk, hogy a glicerin, behatolva a POR fehérjét tartalmazó membránpartikulumok hidrofíl üregeibe, kiszorítja a vizet, a fehérje felületén pedig burkot alkotva a vízmolekulákat a fehérje hidrátburkában stabilizálva térfogatcsökkenést vált ki. A szaharóz molekulák pedig méretüknél fogva a fehérje felületén kapcsolódva stabilizálják a

struktúrát. A térfogatcsökkenés a POR alegységek aggregációját váltja ki, ami egyben protoklorofillid aggregációt is eredményez. Ezt a membránstabilizációt elektronmikroszkópos vizsgálatainkkal is bizonyítottuk.

Annamária Kósa, Zsuzsanna Márton, Katalin Solymosi, Károly Bóka and Béla Böddi (2006) Aggregation of the 636 nm emitting monomeric protochlorophyllide form into flash-photoactive, oligomeric 644 and 655 nm emitting forms in vitro. Biochimica et Biophysica Acta, Bioenergetics – in press, a kefélynyomat ellenőrzése után

4.e) A monomer protoklorofillid formák dominanciájának következménye: lassú klorofill szintézis etiolált borsó epikotilban

A 636 nm-en emittáló protoklorofillid forma (P636) mellett jelentős mennyiségű 628 nm-nél emittáló protoklorofillid forma (P628) is jelen van az etiolált borsó epikotiljában. Ez utóbbi formáról azt feltételezzük, hogy nem a NADPH:protoklorofillid oxidoreduktázhoz vagy legalábbis nem annak aktív központjában kötött monomer állapotú protoklorofillid és/vagy protoklorofill pigment. A 636 nm-es emissziós sávhoz tartozó forma összetett lehet, hiszen csak egy része tud közvetlenül klorofillidde alakulni. A Liegei Egyetem kutatóival együttműködve, a Liege-ben felszerelt nagyfelbontású, a klorofill típusú vegyületek szétválasztására alkalmas HPLC segítségével analizáltuk, hogy milyen pigmentek jelennek meg az epikotil megvilágításakor. Kimutattuk, hogy a protoklorofillid fotoredukciója helyett annak jelentős foto-degradációja megy végbe. Másrészt a fotoredukcióval kialakult klorofillid észterek között nem a fitol-klorofillid, hanem a geranilgeraniol-klorofillid dominált, ami a NADPH igényes geranilgeraniol – dihidrogeranilgeraniol átalakulás gátlódásának a következménye. A klorofill szintézis késleltetése aszkorbát kezeléssel megszüntethető. Arra következtettünk, hogy az etiolált epikotilban jelentős NADPH hiány van. A NADPH alacsony szintje gátolja a prolamelláris test kialakulását és a folytonos fényen történő megvilágítás esetén működő NADPH/NADP⁺ ciklusok működését, azaz a flash-fotoaktív komplexek regenerációja is gátolt. Ennek következtében természetes fényen az etiolált borsó epikotil fotodegradációt szenved.

Béla Böddi, Roland Loudeche and Fabrice Franck (2005) Delayed chlorophyll accumulation and pigment photoreduction in the epicotyls of dark-grown pea (Pisum sativum). Physiologia Plantarum 125, 365-372

4.f) Nehézfém (Hg) hatásának vizsgálata a prolamelláris test szerkezetére és a NADPH-protoklorofillid oxidoreduktáz összetevőire

A NADPH szerepét és a higany gátló hatását részletesen tanulmányoztuk etiolált búzalevelekből készített homogenátumokban. Ez a rendszer modellnek tekintendő, mert a Hg²⁺ *in vivo* csak extrém körülmények között lép reakcióba mindazokkal a komponensekkel, amelyekkel történő reakcióit ebben a munkában kimutattuk. Ebben a munkában viszont leírtuk mindazokat a támadási pontokat, amelyekkel a Hg²⁺ reakcióba léphet. Lényeges szempont, hogy az *in vitro* végrehajtott kísérletekben a Hg²⁺ koncentrációját tetszőlegesen tudtuk változtatni, így el tudtuk különíteni az Hg²⁺ reakciópartnereit. Megállapítottuk, hogy a Hg²⁺ már kis koncentrációja esetén is közvetlenül eloxidálja a NADPH molekulákat. Ennek következtében a megváltozik a prolamelláris test szerkezete, megszűnik benne a membránok

rendezettsége, ugyanis a NADPH egy része nem közvetlenül a NADPH-protoklorofillid oxidoreduktáz (POR) aktív központjában kötött, hanem szerepet játszik a POR alegységek makrodoménekbe történő rendeződésében. A koncentráció növelése következtében, a Hg^{2+} ionok eléri a POR aktív központjában található NADPH-t is. Ezt oxidálva gátolódik a POR működése. További koncentrációnövelés következtében a Hg^{2+} reakciója a protein aminosav oldalláncaival (például az $-\text{SH}$ csoportokkal) válik lényegessé. Ez konformáció-változásokat okoz, amely kiváltja nemcsak a POR makrodomén dezaggregációját, hanem a POR protein-NADPH(NADP^+)-protoklorofillid hármass komplexének megbomlását is. A kiszabadult protoklorofilliddel is közvetlen reakcióba lép a Hg^{2+} . A porfirin gyűrűből kiszorítva a Mg-ot, protofeoforbid keletkezését váltja ki, amely tehát pigment-degradációs termék. Ez utóbbi reakció kapcsán egy érdekes spektroszkópai jelenségre is felhívtuk a figyelmet: a keletkezett protofeoforbid fluoreszcencia emissziós maximuma *in vivo* megegyezik a natív POR-oligomer fluoreszcencia emissziós maximumával, azaz a maximum helyzete és félértékszélessége is azonos a 10 K-n, 0.1 nm-es felbontással mért fluoreszcencia spektrumokban is. A kromofórok közötti különbség kimutatására fluoreszcencia élettídméréseket végeztünk a Krakói Jagelló Egyetem munkatársaival együttműködve. Ennek kapcsán felhívtuk a szakirodalom figyelmét arra, hogy nem elegendő egyetlen módszerrel csak a spektrális tulajdonságok összevetésével strukturális azonosságra következtetni.

Kiseb Hg^{2+} koncentrációknál nem tapasztaltuk a POR makrodomének spektrális tulajdonságainak változását, és a fotoredukciós aktivitás sem változott. A NADPH oxidálódása miatt azonban felgyorsult a fototranszformáció utáni Shibata-shift, azaz a klorofillidet tartalmazó makrodomének szétesése. Ez az eredmény is felhívja a figyelmet a NADPH szerkezetstabilizáló hatására.

Mindezeket a kísérleteket izolált és tisztított prolamelláris test preparátumokkal is elvégeztük annak érdekében, hogy az egyes reakciókat tisztábban figyelhessük meg. Emellett elektronmikroszkópos vizsgálatokat is végeztünk, és megállapítottuk a NADPH oxidálása következtében létrejövő finom membránszerkezeti változások mértékét: a prolamelláris testekben az elemi cellák méretváltozását is. Ebben a munkában szép összefüggéseket mutattunk ki a struktúra és a POR aktivitása között.

Katalin Solymosi, Katalin Lenti, Beata Myśliwa-Kurczel, Judit Fidy, Kazimierz Strzałka, Béla Böddi (2004) Hg^{2+} reacts with different components of the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase macrodomains. Plant Biology 6, 358-368

Katalin Solymosi, Beata Myśliwa-Kurczel, Károly Bóka, Kazimierz Strzałka, Béla Böddi (2006) Disintegration of the prolamellar body structure at high concentrations of Hg^{2+} . Plant Biology – in press: a kefélyomat ellenőrzése után

4.g) Modellvizsgálat: a pigmentaggregáció és a fluoreszcencia spektroszkópai tulajdonságok közötti kapcsolatok tanulmányozása

A Hg^{2+} hatásának vizsgálata során sikeresen alkalmaztuk a fluoreszcencia élettídmérést a nehézfém hatására kialakult kromofór megkülönböztetésére, mivel a hagyományos steady state spektroszkópai mérések nem mutattak különbséget. A fluoreszcencia élettídmérések eredmények értékelésében viszont problémát jelentett, hogy a szakirodalomban csak szórványadatok léteznek a protoklorofill és protoklorofillid formák fluoreszcencia

életidejéről, sőt számos esetben elméleti kérdések is nyitottak. Ilyen elméleti kérdés a fluoreszcencia életidő és a pigmentek aggregációja közötti összefüggés. A klorofill típusú pigmentek elektronrendszere ugyanis olyan nagyméretű, hogy az elméleti kvantummechanikai számítások csak nagymértékű egyszerűsítések után adnak eredményeket vagy nem végezhetőek el. Emiatt modellrendszert állítottunk össze, amelyben fehérjementes környezetben különböző protoklorofill aggregátumokat hoztunk létre. A modellrendszer a Triton X-100 tömény, micelláris és szubmicelláris oldata volt, amelyben változtattuk a protoklorofill koncentrációját. Ezzel Triton-protoklorofill, protoklorofill-víz komplexeket, illetve micellákba épült különböző méretű, dimer-oligomer pigmentkomplexeket, emellett nagy micellakonzentráció esetén az intermicelláris térben lokalizált protoklorofill-hidrát komplexeket állítottunk elő. A rendszer hígításával a struktúrák átépüléseit váltottuk ki. A párhuzamosan mért steady state fluoreszcencia emissziós és életidő mérések során megállapítottuk, hogy e két módszer kombinációja különösen alkalmas a pigmentkomplexek jellemzésére, ugyanis hasonló emissziós maximumok esetén az életidő különbözhet, illetve komplex rendszerek esetén hasonló életidő adatok különböző formák kombinációival jönnek létre.

Beata Myśliwa-Kurziel, Katalin Solymosi, Jerzy Kruk, Béla Böddi, Kazimierz Strzalka (2006): Protochlorophyll complexes with similar steady-state fluorescence characteristics can differ in fluorescence lifetimes. A model study in Triton X-100. (manuscript submitted to the Journal of Photochemistry and Photobiology)

5. Etioplasztiszok, etio-kloroplasztiszok, átmeneti proplasztiszok, raktározásra módosult átmeneti proplasztiszok és etioplasztiszok leírása természetes körülmények között fejlődött virágzatokban, rügyekben, termésekben és raktározásra módosult szervekben

5.a) Természetes etiolált állapot a fejeskáposzta belsejében

A protoklorofillid – klorofillid és az etioplasztisz - kloroplasztisz átalakulást a szakirodalom többsége sötétben nevelt csíranövényekben vizsgálja, mivel a reakció fényfüggése miatt sötétben szinkronizálnának ezek a folyamatok, és az egyes részlépések csak így mutathatók ki. Gyakran felmerülő kérdés azonban, hogy mennyire természetes állapot alakul ki a 8-14 napos sötétben történő neveléskor. Emiatt olyan kísérleti objektumokat kerestünk, amelyekben egyes szövetek, szervek lefedettsége miatt feltételezhető volt a sötétben való differenciálódás, az etiolált állapot.

A fejeskáposzta belső levélrétegei alkalmasnak látszottak arra, hogy megfeleljenek a fenti feltételeknek. Ez a módosult rügynek tekinthető szerv ugyanis kifejlődése korai szakaszában szorosan egymásra boruló leveleket fejleszt. A külső levélrétegek így optikai szűrőként működve csak a protoklorofillid – klorofillid és az etioplasztisz - kloroplasztisz átalakulásban hatástalan zöld fényt engedik át. A levélrétegek abszorpciós/transzmissziós spektrumának és fényáteresztő képességének vizsgálata igazolta feltevésünket, hogy a káposztafej belsejében teljesen fényhiányos állapot van. A sok levélréteg csökkenő fénygradienst alakít ki, így a zöldülés legkülönbözőbb átmeneti állapotai figyelhetőek meg.

A legbelső levelek primordiális állapotban voltak: a szkennig elektronmikroszkópos képek sztómáprimordiumokat mutattak, a sejtekben proplasztisz jellegű plasztiszok jelentek meg, amelyekben csak kevés belső membrán volt jelen. Protoklorofillid és észterei voltak jelen 2:1 arányban, ez az arány jelentősen eltér az etiolált csíranövényekétől. A pigmentek

többsége monomer állapotban volt, csak kevés flash-fotoaktív POR dimert és oligomert tartalmaztak. A legkülső levelek ugyanolyanok voltak, mint más növényfajokban a teljesen kifejlett zöld levelek. A köztes rétegekben két fő típust tudtunk elkülöníteni, de számtalan átmeneti állapot is megfigyelhető volt. Az egyik típusban a klorofill pigmentek jelenlétét egyetlen éles emissziós sáv mutatta 680-682 nm-nél és a protoklorofillid sávjai csak kis intenzitásúak voltak 632 és 553 nm-es maximummal. Az éles klorofill sáv a megvilágított, majd ezt követően hosszú ideig sötétben tartott szervekre jellemző. A másik típusban a csak nagyon kis intenzitású protoklorofillid sávok mellett a zöld növények teljesen fejlett fotoszintetikus apparátusára jellemző klorofill-protein komplexek sávjai jelentek meg: a II. és az I. fotokémiai rendszerek tehát itt már ki tudtak épülni. Lényeges megemlíteni, hogy a 653-655 nm-nél fluoreszkáló protoklorofillid formák flash-fotoaktívak voltak, és a megvilágítás után ismételt sötétben inkubált levelekben e forma regenerációja is végbement, csakúgy, mint az etiolált csíranövények leveleiben. Érdekes plasztisztípusokat figyelhettünk meg a különböző levélrétegekben. A legbelső rétegben proplasztisz típusú plasztiszok voltak, amelyekben kevés, perforált szimpla belső membránt figyeltünk meg. Emellett ezekben a plasztiszokban keményítő szemcse is kialakult. Ritkán laza szerkezetű prolamelláris test is megfigyelhető volt. Az átmeneti levelekben (4.-10. réteg) nagyobb méretű plasztiszok voltak 4-5 µm átmérővel, amelyekben a legfeltűnőbbek voltak a nagyméretű keményítő szemcsék. Ezek között szórtan kapcsolt, gránum jellegű elrendeződésben tilakoid membránok jelentek meg. Különösen a belsőbb levélrétegek plasztiszaira jellemző volt a fitoferritin megjelenése is jellegzetes kristályos szerkezetével (a Fe jelenlétét ezekben a struktúrákban EELS –electron energy loss spectroscopy- mérésekkel igazoltuk).

Katalin Solymosi, Krisztina Martinez, Zoltán Kristóf, Christer Sundqvist, Béla Böddi (2004) Plastid differentiation and chlorophyll biosynthesis in different leaf layers of white cabbage (Brassica oleracea cv. capitata). Physiologia Plantarum 121, 520-529.

A fent felsorolt eredmények adták Solymosi Katalin doktori értekezésének jelentős részét is:

Solymosi Katalin: A NADPH:protoklorofillid oxidoreduktáz enzim felhalmozódása természetes körülmények között és működésének analízise in vitro. Doktori értekezés ELTE, 2004.

Mivel nagy különbségeket találtunk az egyes levélrétegek plasztiszainak differenciáltságában, felmerült a kérdés, hogy milyen dinamikával megy végbe a proplasztiszokat, etioplasztiszokat, etio-kloroplasztiszokat vagy kevés kloroplasztiszt tartalmazó levelek zöldülése. Ennek vizsgálata céljából elkülönítettük a káposzta levélrétegeit, és az egyes leveleket azonos körülmények között világítottuk meg. Érdekes módon, alacsony fényintenzitáson a legbelső levelek klorofill-felhalmozása egy kezdeti késés után felgyorsult, és ezek a levelek sokkal hamarabb érték el a teljes differenciált állapotot, mint a kezdetben már klorofillt is tartalmazó külsőbb rétegekből származó levelek. Nagyobb fényintenzitások (a természeteshez közeli értékek) viszont fotodegradációt váltottak ki a kevés klorofillt és több protoklorofillidet tartalmazó levelekben. Ez a megfigyelésünk gyakorlati szempontból is fontos, ugyanis a kereskedők folyamatosan eltávolítják a hervadt, előregedett külső levélrétegeket, hogy ezzel a káposzta frissebbnek tűnjön, de ezzel kiváltják a következő külső levélrétegek fotodegradációját, gyors öregedését.

A zöldülésre vonatkozó eredmények egy részét egy konferencia kiadványban publikáltuk, de ezt a munkát további mérésekkel kiegészítve (membránlipidek analízise, fluoreszcencia leképezés és annak analízise pl. fotoszintetikus aktivitás-mérések) egy következő OTKA pályázatban szeretnénk folytatni.

Katalin Solymosi, Krisztina Martinez, Zoltán Kristóf, Christer Sundqvist, Béla Böddi (2005)
**The effect of prolonged etiolation inside the cabbage (*Brassica oleracea* L. cv. *capitata*)
 head and the greening of the different leaf layers. *Acta Biologica Szegediensis* 49 (1-2) 227-228.**

5.b) Átmeneti etiolált állapot fás növények rügyeiben

Felmerült a kérdés, hogy a fejeskáposztában megfigyelt etiolált állapot előfordul-e fás növények rügyeiben. A rügypikkelyek, és/vagy a szorosan egymásra boruló levélkezdemények optikai szűrőként működhetnek, és így a káposztánál megfigyeltekhez hasonlóan a belső rétegekben csökkent fényintenzitást vagy teljes fényhiányt állíthatnak elő. Ennek érdekében 37 fajról gyűjtöttünk be rügyeket a kísérleteink számára. Valamennyi esetben a rügyeket gyenge zöld fényben boncoltuk fel, és megmértük a belső levélkezdemények 77 K fluoreszcencia emissziós spektrumát. A pigmentek és pigmentformák arányaira az emissziós sávintenzitások arányaiból következtettünk. Az energiamigráció miatt ezek az arányok nem hozhatók közvetlen kapcsolatba az egyes pigment komplexek mennyiségével, de jó kvalitatív képet adnak az egyes rügyekben található plasztisztípusokra.

FAJNÉV	Rügy méret (mm)	F633/F682	F740/F682	F633/F655
1. <i>Fraxinus excelsior</i> L.	5-12	3.978	0.405	2.191
2. <i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl.	5-9	2.858	0.401	2.045
3. <i>Fraxinus ornus</i> L.	8-13	0.473	0.159	2.110
4. <i>Juglans regia</i> L.	7-14	0.423	0.229	2.297
5. <i>Ailanthus altissima</i> P. Mill.	6-15	0.277	0.165	2.522
6. <i>Aesculus hippocastanum</i> L.	17-27	0.116	0.269	1.369
7. <i>Juglans nigra</i> L.	8-11	0.240	1.946	2.449
8. <i>Rhus hirta</i> (L.) Sudw.	5-7, 10-11	0.216	1.332	3.193
9. <i>Syringa vulgaris</i> L.*	10-20	0.210	1.594	2.879
10. <i>Acer pseudoplatanus</i> L.	15-23	0.128	0.674	1.792
11. <i>Melia azederach</i> L.	4-7	0.098	1.893	3.491
12. <i>Populus nigra</i> L.	12-22	0.075	1.258	2.117
13. <i>Acer platanoides</i> L.	15-20	0.073	1.576	2.675
14. <i>Rhus verniciflua</i> Stokes	3-5	0.071	1.043	4.800
15. <i>Platanus acerifolia</i> Willd.	8-11	0.054	0.994	0.885
16. <i>Sorbus aria</i> (L.) Crantz	20-24	0.039	2.070	3.084

17. <i>Quercus robur</i> L.	5-8	0.036	2.476	3.425
18. <i>Hedera helix</i> L.*	7-8	0.026	1.385	2.017
19. <i>Morus nigra</i> L.	7-10	0.024	1.091	1.653
20. <i>Quercus pubescens</i> Willd.	6-8	0.018	2.630	3.118
21. <i>Corylus avellana</i> L.*	17-24	0.015	2.426	2.292
22. <i>Cotinus coggygria</i> Scop.*	10-12	0.012	3.016	2.987
23. <i>Tilia platyphyllos</i> Scop.	9-10	0.011	2.193	4.052
24. <i>Tilia cordata</i> Mill.	8-10	0.010	2.000	2.654
25. <i>Carpinus betulus</i> L.	10-12	0.009	3.787	1.649
26. <i>Acer negundo</i> L.*	10-15	0.008	2.667	2.113
27. <i>Morus alba</i> L.	6-8	0.006	3.019	1.957
28. <i>Philadelphus coronarius</i> L.*	19-21	0.006	0.944	1.998
29. <i>Quercus petraea</i> Liebl.	10-13	0.006	1.775	3.216
30. <i>Populus canescens</i> L.*	7-8	0.006	1.277	0.941
31. <i>Magnolia stellata</i> Max.	10-17	0.005	3.100	2.461
32. <i>Salix cinerea</i> L.*	13-16	0.004	2.730	2.196
33. <i>Parthenocissus tricuspidata</i> Planch. *	14-16	0.004	2.045	2.095
34. <i>Liquidambar styraciflua</i> L.*	14-16	0.002	2.175	10.726
35. <i>Celtis australis</i> L.*	10-13	-	2.443	-
36. <i>Fagus sylvatica</i> L.	20-25	-	2.147	-
37. <i>Ficus carica</i> L.	10-17	-	2.005	-

Eredményeink azt mutatták, hogy a legtöbb faj rügyében a belső levélkezdeményekben megjelenik a protoklorofillid. Egyes esetekben a flash-fotoaktív, 655 nm-en emittáló komplex is jelentős mennyiségű, ami azt bizonyítja, hogy a rügydifferenciálódás adott szakaszában teljes fénymentes állapot van a rügy belsejében. Ez azért is érdekes, mert a következő évi rügyek differenciálódása már az adott év vegetációs periódusában, pl. augusztusban megkezdődik. Ilyenkor a fejlődő szövetek fényben differenciálódnak, majd a rügpikkelyek megvastagodásakor, illetve több levélkezdemény-réteg kialakulásával a rügyek bezáródnak. Ebben az állapotban telelnek át, majd a következő év tavaszában a metabolikus aktivitás megnövekedésével együtt új levélkezdemények fejlődnek a rügy belsejében a fénytől elzártan. Más esetekben viszont a rügy záródása nem teljes, és így a tél végén már a teljes fotoszintetikus apparátus kialakul. A rügpikkelyek optikai tulajdonságainak vizsgálata jó összhangban volt a fentiekkel. 14 faj pikkelyleveleinek transzmissziós spektrumát

tanulmányozva azt tapasztaltuk, hogy egyes fajoknál a pikkelylevél fényáteresztő képessége 700 nm-nél rövidebb hullámhosszoknál nagyon kicsi. Más fajoknál a kemény és színes pikkelylevél alatti hátrányos burkolólevél is csökkenti a transzmittanciát vagy a pikkelylevélben levő klorofill szűri ki a klorofill bioszintézisét aktiváló fényt.

Fajnév	Rügyméret	*T440	T650	T680	T750
<i>Ailanthus altissima</i> P. Mill.	6–15	3.0	22.5	12.0	94.4
<i>Malus domestica</i> Mansf.	7–10	3.0	17.0	22.0	85.7
<i>Prunus domestica</i> L.	7	3.7	33.9	35.0	74.9
<i>Juglans regia</i> L.	7–14	3.7	12.8	7.2	79.7
<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	17–27	3.7	10.9	6.3	85.8
<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.	6	4.8	19.2	10.2	97.2
<i>Corylus avellana</i> L.	17–24	8.9	24.5	17.0	93.9
<i>Rosa canina</i> L.	4–6	11.7	50.5	38.7	93.1
<i>Fraxinus excelsior</i> L.	5–12	16.1	19.2	16.1	65.6
<i>Sambucus nigra</i> L.	7–8	16.8	47.6	43.1	92.8
<i>Acer pseudoplatanus</i> L.	17–23	16.9	64.3	49.8	96.4
<i>Prunus avium</i> L.	8	18.7	56.0	39.2	96.3
<i>Euonymus europaeus</i> L.	7	26.7	74.1	66.3	98.0
<i>Rubus idaeus</i> L.	8	32.4	70.4	71.6	94.0

* T=transzmittancia

Katalin Solymosi, Béla Böddi (2006) Optical properties of bud scales and protochlorophyll(ide) forms in leaf primordia of closed and opened buds. Tree Physiology 26, 1075-1085.

A fent felsorolt eredmények adták Solymosi Katalin doktori értekezésének jelentős részét is: **Solymosi Katalin: A NADPH:protoklorofillid oxidoreduktáz enzim felhalmozódása természetes körülmények között és működésének analízise in vitro. Doktori értekezés ELTE, 2004.**

5.c) Az átmeneti etiolált állapot részletes jellemzése vadgesztenye (*Aesculus hippocastanum* L.) rügyeiben

A sokféle fajnál megismert jelenségeket részletesen tanulmányoztuk a vadgesztenye rügyeiben. Ezek a rügyek már augusztusban kialakulnak, ilyenkor még a rügy pikkelyek zöldek. A rügy fejlődése során viszont megbarnulnak, jellegzetes mirigygomolyok jelennek meg a külső felületükön, amelyek működése eredményeképpen ragadós váladék borítja a következő tavaszi rügyeket. A korábban fényáteresztő rügy pikkely érdekes optikai tulajdonságú lesz: 680-690 nm-nél rövidebb hullámhosszú tartományban csak minimális a transzmittancia, 700 nm felett viszont közel 100 %; a transzmissziós spektrum optikai levágószűrőéhez hasonlít. Mivel a fitokróm rendszer indukciójához szükséges 660 nm-es fényt ez a rügy pikkely nem ereszt át, de az inaktiváló 730 nm-es fényt igen, érdekes fotoregulációt tesz lehetővé ez az optikai sajátosság. Amíg a rügy zárt, a levélkezdemények fejlődése gátolt. A rügy bezáródása előtti fejlődési állapotban keletkezett klorofill-a és klorofill-b sajátos, „tárolt” komplex formában mutatható ki a zárt rügyekben is (682 nm-nél ad éles emissziós sávot). Emellett viszont kimutatható a protoklorofillid is, ami 630 nm körül emittáló monomer és flash-fotoaktív, 644 és 655 nm-nél emittáló komplex formába rendeződik. A téli alvórügyben a rövid hullámhosszú forma dominált. A rügyfakadás idején a még takart levélkezdeményekben viszont a hosszabb hullámhosszokon emittáló formák mennyiségének megnövekedése volt jellemző. A levélkezdemények elektronmikroszkópos vizsgálata érdekes etio-, etio-kloro- vagy kloro-etio-plasztisz átmeneti plasztiszállapotok kialakulását mutatta.

A rügyeken végzett méréseink egyértelműen bizonyították, hogy az etiolált állapot a természetben is kialakul, az etioplasztiszok tehát nem laboratóriumi műtermékek, hanem az egyedfejlődés egy átmeneti szakaszára jellemzőek.

Katalin Solymosi, Károly Bóka, Béla Böddi (2006) *Transient etiolation: protochlorophyll(ide) and chlorophyll forms in differentiating plastids of closed and breaking leaf buds of horse chestnut (Aesculus hippocastanum)*. *Tree Physiology* 26, 1087-1096.

A fent felsorolt eredmények adták Solymosi Katalin doktori értekezésének jelentős részét is: **Solymosi Katalin: *A NADPH:protoklorofillid oxidoreduktáz enzim felhalmozódása természetes körülmények között és működésének analízise in vitro*. Doktori értekezés ELTE, 2004.**

5.d) Pigment és plasztisz formák természetes és in vitro burgonya gumókban és a természetes gumókon fejlődött hajtásokban

Ismert jelenség, hogy a természetes fényen tartott burgonya gumó megzöldül, azaz a raktározásra módosult parenchima klorenchimává alakul át. E jelenségnek közvetlen gyakorlati vonatkozása van, hiszen a megzöldült szövetekben (a klorofill bioszintézisétől független úton) a klorofillal párhuzamosan mérgező hatású anyagok, (pl. α -szolanin és α -chaconin) is keletkeznek. Ebben a munkában azt tanulmányoztuk, hogy a sötétben, gyenge és erős fényintenzitáson tartott gumókban hogyan történik meg a klorenchima kialakulása, milyen plasztiszok és klorofill-protein komplexek jelennek meg, illetve a fényen vagy félárnyékban tartott gumókban megjelennek-e a klorofill bioszintézis előanyagai, és ezzel párhuzamosan az etioplasztiszok. Megállapítottuk, hogy az élelmezési célra árusított zöldes színű és a fényen nevelt gumókban ugyanolyan klorofill-protein komplexek vannak jelen, mint bármilyen zöld levélben, tehát megtalálható az I. és a II. fotokémiai rendszer összes klorofill-protein komplexe (a fő fluoreszcencia emissziós sávok 686, 694 és 736 nm-nél vannak). A gumó jó fényáteresztő képességének köszönhetően nemcsak a periderma alatt, hanem egy 5 cm-es átmérőjű gumó belsejében is kimutathatók a fenti komplexek. A felszíni rétegekben szabályos szerkezetű gránumos kloroplasztiszokat találtunk. A mélyebb rétegekből vett mintákban is gránumos kloroplasztiszok voltak, de a tilakoid membránok között nagyméretű keményítő szemcsék jelentek meg. A hosszú ideig sötétben tárolt gumókban eltűntek a zöld levelekre jellemző emissziós sávok, helyettük 676 nm-nél jelent meg egy éles emissziós sáv, ami a hosszú ideig sötétben tartott, eredetileg zöld növények jellegzetes klorofill formája. (Szerkezete ismeretlen, távolabbi célunk e sáv eredetének vizsgálata.) A 90 napig sötétben tárolt gumók fluoreszcencia spektrumában viszont megjelent a protoklorofillid emissziós sávja 634 nm-nél. Érdekes plasztisz formát írtunk le ezekben a gumókban: szegényes belső membránrendszerét tekintve proplasztisz jellegű plasztiszok jelentek meg, amelyek szokatlan módon nagyméretű keményítőszemcsét is tartalmaztak, és méretük kb. 3 μ m volt. A pigmentanalízis azt mutatta, hogy protoklorofillid halmozódott fel, ami alkalmas újabb klorofill szintézisére. E folyamat végbe is ment, amikor e gumókat megvilágítottuk.

A félárnyékban hajtattott gumókon fejlődött hajtásokban a fentiekhez hasonló folyamatok mentek végbe, de a protoklorofillid már pár napos sötétben tartás után megjelent. A 60 napig sötétben tartott hajtásokban öregedő etioplasztiszok is megjelentek. Ez az eredmény azért is érdekes, mert ilyen hosszú etiolált állapot a zöldülés modelljeiként tartott csíranövényekben nem maradhat fenn, hiszen ez utóbbi tápanyagforrása megszűnik, és a

növény elpusztul. A burgonya esetében viszont a gumóban gyakorlatilag korlátlan mennyiségű raktározott tápanyag van.

Molekuláris biológiai és a burgonya biokémiai vizsgálataiban gyakran használnak *in vitro* mikrogumókat, amelyeket általában zöld növények hónaljtrügyéből nevelt növénykéken alakítanak ki speciális, nagy citokinin és szaharóz koncentrációjú táptalajon a tenyészeteket sötétben tartva. Az így fejlődött fehéres színű hajtások csúcsán vagy oldalhajtása helyén maximum 8 mm átmérőjű mikrogumók alakulnak ki. A fluoreszcencia emissziós vizsgálatok azt mutatták, hogy a mikrogumókban, a gumó teljes térfogatában klorofill-protein komplexek vannak jelen, amelyek 678 és 683 nm-nél adnak emissziós sávot. Emellett kimutatható volt a klorofill előanyagok jelenléte is. E pigmentek stabilan megmaradtak akár 55 napig sötétben tartott tenyészetekben is, feltehetően a magas szaharóz és citokinin jelenléte miatt. Érdekes, proplasztiszra emlékeztető szerkezetű plasztiszok jelentek meg a mikrogumókban: csak fejletlen belső membrán-kezdemények voltak jelen. A mikrogumók belsejében kisméretű, 2 µm átmérőjű plasztiszok voltak, amelyek belsejét szinte teljesen keményítőszemcsék töltötték ki. Mivel a mikrogumók sötétben fejlődtek, e keményítőszemcsék nyersanyaga a táptalajban található szaharóz lehetett. Megvilágítás hatására a mikrogumók teljes térfogatában kialakultak a zöld levelekre jellemző klorofill-protein komplexek és gránumos kloroplasztiszok.

A munka Szenzenstein Andrea tudományos diákköri dolgozatának (2004-ben ELTE TTK Kari konferencián 3. helyezés, és 2005-ben az Országos Konferencián különdíj), szakdolgozatának, jelenleg doktori programjának anyaga. Egyes részeit a 2006. június 22-23-án megrendezett XII. Magyar Növényanatómiai Szimpóziumon mutattuk be, több kézirat elkészítése folyamatban van:

Szenzenstein Andrea, Solymosi Katalin, Bóka Károly, Böddi Béla (2006): Plasztisz-differenciálódás in vitro kultúrában létrehozott burgonya (Solanum tuberosum L.) mikrogumókban

JATE Press ISBN 963 482 767 5, p.62-66

6. A kiválasztásra differenciálódott plasztiszokat tartalmazó növények azonosítása, kiválasztószervük jellemzése fénymikroszkópiával, elektronmikroszkópiával, a termelt anyagok jellemzése

A plasztisz-differenciálódás érdekes változatát figyeltük meg kiválasztásra módosult sejtekben. Ismeretes, hogy a kloroplasztiszok számos növényi metabolit szintézisében vesznek részt. Ez részben annak köszönhető, hogy egyes metabolitok szintéziséhez szükséges genetikai információ részben vagy egészben a plasztisz genomjában kódolt. Egyes kiválasztó sejtekben a kiválasztott szekunder anyagcsere termékek a plasztiszban halmozódnak fel.

Ilyen sejteket találtunk a *Tagetes minuta* virágzati felleveleiben kialakult skizogén kiválasztó struktúrák epitél béléseiben. Azt figyeltük meg, hogy a kloroplasztiszok fokozatosan változtak meg a parenchimasejteknek kiválasztószervvé történő átalakulásával párhuzamosan. A parenchima sejtekben a differenciálódás elején csak néhány apró, elektronenz sztrómájú és kevés tilakoiddel rendelkező plasztisz van. Egy következő fázisban a plasztiszok száma megnő, majd burkolómembránjuk alatt a perifériális rétegben apró vezikulumok halmozódnak fel (keresztmetszetben gyöngyfüzérszerű elrendezésben jelennek meg). Váladékudvar figyelhető meg a szintestek burkolómembránja külső oldalán is. A következő stádiumban többrétegű epitél jelenik meg a skizogén járat körül. A belső és a második sejt sor vége kiválasztó tevékenységet. Ezekben a sejtekben a plasztiszok szerkezete

sajátosan átalakul: a tilakoidok eltűnnek, a sztrómában nagy mennyiségű váladék halmozódik fel.

A kloroplasztiszok teljes átalakulását figyeltük meg a *Madia* exogén kiválasztó mirigyszőreiben, amelyek szintén a virágzati fellevelek sajátosságai. A soksejtű mirigyszőr feji sejtjében a differenciálódás kezdeti szakaszában ép, gránumos kloroplasztiszok találhatóak. A differenciálódás során a kloroplasztiszok tilakoid membránjai fokozatosan degradálódnak, a klorofill bioszintézise módosul, és az érés meghatározott szakaszában a klorofill bioszintézisnek csak előanyagai mutathatók ki.

A plasztisz-differenciálódás vizsgálatát a kiválasztószervekben több más növényfajra is kiterjesztettük (*Robinia* nemzetség egyes fajai, *Salvia glutinosa*, *Sonchus palustris* és *Proboscidea* fajok). Ezekben a fajokban is megfigyeltük a plasztiszok részvételt a kiválasztásban függetlenül attól, hogy a plasztisz milyen fejlettségi állapotban van.

A publikációk elkészítéséhez szükséges a kiválasztott anyagok azonosítása, melyben metodikai problémák léptek fel. Ezen kívül, különböző fejlettségi állapotú növényi anyag vizsgálatára is szükség van. Várhatóan 2006-2007-ben készítünk publikációt a fenti eredményekből.

7. Előkészítő, a munkatervben nem szereplő mérések különböző fénytől elzártan fejlődő nem levél szervekben

A pályázatban elvégzett munka során számos témát lezártunk és publikáltunk, ugyanakkor több témában is új kutatási kérdések vetődtek fel, amelyek közvetlenül nem tartoznak a jelen pályázat munkatervébe, viszont elméleti vagy gyakorlati jelentőségük miatt fontosak. Ezekben a témákban előkísérleteket végeztünk, részeredményeinket konferenciákon bemutattuk, de nemzetközi folyóiratban történő publikálásukhoz rendszeres további kutatásra van szükség. A Tanszéken dolgozó tudományos diákköri munkát végző és szakdolgozatos hallgatók (évente 10-15) nagy segítséget adnak ezekhez a mérésekhez. E témák kidolgozására egy újabb tematikus OTKA pályázatot tervezünk benyújtani. Az alábbiakban a főbb témákat mutatom be.

1) A fejeskáposztában megfigyelt jelenségek leírása egyéb növényekben: fejes saláta, lila káposzta, kelkáposzta, Endivia levélrétegeiben. A pigmenttartalmak, a levelek egymásra borulásának mértéke (a fej nyitottsága), a levelek rostozottsága különböző, ezért a fejeskáposztában leírt jelenségek variációit kaptuk. A pigmentszintézis eltérései a fenti növények leveleiben, a fényérzékenység különbségei a betakarítás utáni minőségi változásokat befolyásolják, tehát közvetlen gyakorlati vonatkozásai is vannak.

2) Több növény esetében a sötétben fejlődött hajtás vagy levél nagyon hosszú életű, mivel különböző raktározó szövetet tartalmazó szervből fejlődik. Így idősebb, akár 30-60 napos etiolált szervek is nevelhetők, amelyekben a gerontoplasztiszok, és etio-gerontoplasztiszok is tanulmányozhatók. Hagymákból, gyöktörzsekből, raktározó gyökerekből hajtított levelek és száraz vizsgálatát kezdtük meg.

3) Ha a megfelelő indukciós kezelést megkapták, a sötétben kihajtatott hagymák etiolált virágkezdeményt hoznak létre. Tulipán, liliom virágalkotóiban (a külső és belső lepelkör levelei, porzó- és termőlevelek) kezdtük el az etioplasztiszok vizsgálatát.

4) Érdekes eredményeket kaptunk az articsóka virágzati felleveleinek, illetve az összeboruló fellevelek alatt sötétben kialakult egyes virágok vizsgálatával.

5) Egyes termések tanulmányozása során speciális plasztiszokat figyeltünk meg. Az avokádó és a cukordinnye vastag, fényszűrőként működő terméshála alatt a terméshúsban fénygradiens alakul ki. A terméshús belső rétegeiben protoklorofillt és protoklorofillidet mutattunk ki.

A napraforgó kaszattermésének fala gyakran hetekig a sziklevelelen marad a csírázás után. Ennek következtében a differenciálódó sziklevelel takart részén átmeneti etio-kloroplasztiszok

és etioplasztiszok fejlődnek természetes körülmények között. Több csonthéjas termésben az endokarpium alatti szövetekben klorofill előanyagokat mutattunk ki, amely szintén speciális plasztiszok jelenlétére utal.

6) A plasztisz-differenciálódást tanulmányoztuk különböző nyitvatermő növényekben: csíranövényekben és sötétben hajtított hajtásokon. A tankönyvi információkkal ellentétben ugyanis több növényfaj esetében is sikerült kimutatnunk a protoklorofillid felhalmozódását, tehát etiolálhatók voltak. Részletes vizsgálatokat végeztünk a páfrányfenyő - *Ginkgo biloba* etiolált csíranövényei és sötétben hajtított szárában végbemenő zöldülési folyamatokon. Tanulmányoztuk a klorofill felhalmozódásának hőmérséklet-függését, fényintenzitás-függését, oxigén szabadgyökök keletkezését fénystressz hatására.

7) Speciális lézerténnel történő megvilágítások kombinációjával nemzetközi együttműködésekben tanulmányozzuk a protoklorofillid – klorofillid átalakulást, az egyes komplexeket különböző sorrendben átalakítva.

8) Ezekben a munkákban elkerülhetetlen a klorofill típusú pigmentek pontos analízise. Ezt nemzetközi együttműködésben végzett HPLC analízissel tervezzük, amíg nem sikerül hazai pályázatból saját laboratóriumot felállítani.

8. Tervezett, de nem végrehajtott munka:

Mikorrhizált növények előállítás, metabolizmusuk vizsgálata, fotoszintetikus apparátusuk jellemzése, mikorrhiza modell összeállítása, mikorrhizált és steril tenyészetek stressz-reakcióinak összehasonlítása

A munkatervben szerepelt annak a kérdésnek a vizsgálata, hogy a mikorrhiza kialakulása hogyan befolyásolja a növény fotoszintetikus apparátusának a kialakulását. Munkahipotézisünk az volt, hogy a gazdanövény és a mikorrhiza közötti metabolikus kölcsönhatás egyik aspektusa lehet az, hogy a gomba bizonyos szerves anyagokat exportál a növény számára, ezzel csökkenhet a fotoszintetikus aktivitás jelentősége. A gomba-növény interakció ilyen szélsőséges példáját ismerjük: a *Neottia nidus-avis* kosborban ennek következtében a második fotokémiai rendszer és a vele kapcsolatos reakciók (vízbontás) megszűnt, és csak az első fotokémiai rendszer maradt meg, ami csak ciklikus fotofoszforilációt működtet, de NADPH termelés, és ennek következtében fotoszintézis sincs. A különböző kosboroknál köztes állapotok figyelhetők meg: a klorofilltartalom szélsőséges értékek között változik. Ettől eltérő lehetőség, hogy a mikorrhiza védelmet ad a növénynek: stresszorok jelenlétében a steril növényekhez képest magasabb pigmenttartalom, fotoszintetikus aktivitás és produktivitás alakul ki. Ilyenkor a gomba például segít a nehézfémek megkötésével vagy a vízellátás egyensúlyban való tartásával.

E kérdés vizsgálatára mesterséges mikorrhiza-növény rendszert terveztünk kialakítani, amiben tisztán vizsgálni lehet a metabolikus kapcsolatokat. A csíranövények mikorrhizáltatása után folyamatosan nyomon követtük volna a fotoszintetikus apparátus szerveződését fényben és sötétben nevelt növényekben. A kísérletekhez szükséges tenyész-edény rendszert megterveztük, és kiválasztottuk a megbízható forrásból beszerezhető gomba törzseket is. Sajnálatos módon, e munka végrehajtásába közbeszólt a pályázatból történt elvonás, amelynek nemcsak az összege, de az időzítése is megghiúsította ezt a munkát. Ezeket a több hónapig futó kísérleteket csak akkor tudjuk végrehajtani, ha a kísérleti tervnek megfelelő ütemezéssel kapjuk meg a megfelelő pénzügyi támogatást.

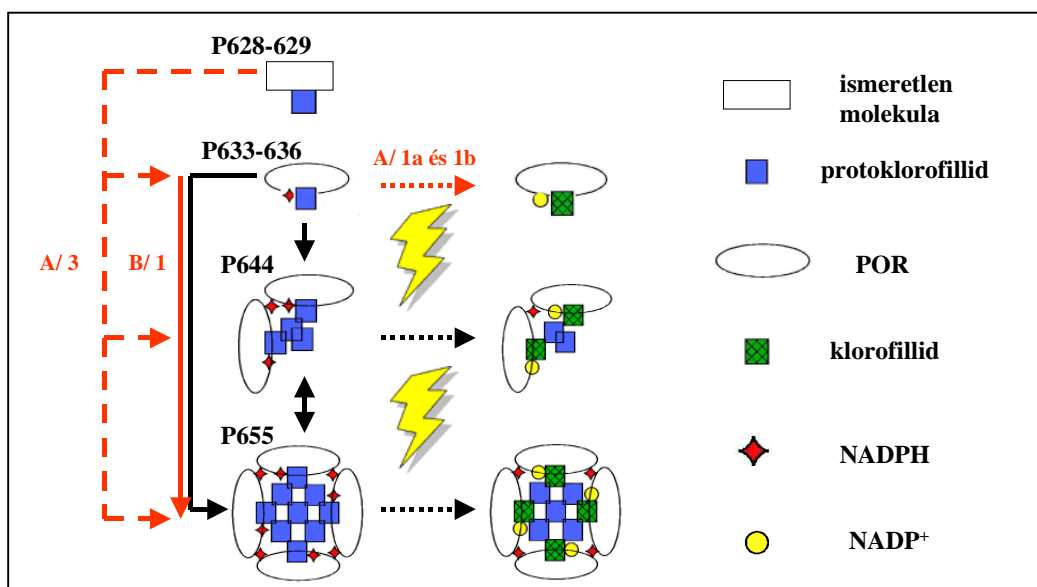
A munkatervben szerepelt az elicitorok és elicitációs hatások tanulmányozása is. Ennek a kutatásnak az lett volna a célja, hogy a szövet és szervtenyészetekben kapott

anyagokon tanulmányozzuk a plasztisz-differenciáció szabályozását. Ezt a munkát is hátráltatta az a tény, hogy a szövettenyészetekkel végzett kísérleteket hónapokkal előre kell tervezni. A tenyészetek több hónapos kialakítása után további több hétre van szükség ahhoz, hogy az elicítációs hatásokat vizsgálhassuk, hiszen a kialakított tenyészeteket kell - néha többször is - továbboltani az elicított tartalmazó táptalajra, vagy friss kontroll táptalajra, és a tenyésztési körülményeket kell változtatni. Ezt a kísérletet is csak akkor lehet elvégezni, ha a kísérleti tervnek megfelelő ütemezéssel kapjuk meg a megfelelő pénzügyi támogatást.

9. Következtetések: A NADPH-protoklorofillid oxidoreduktáz makrodoménjének szerkezeti modellje, összefüggés a monomerré, dimerré és oligomerré történő szerveződés valamint a fotoredukció hatékonysága illetve a fotooxidációs körülmények kialakulása között.

A pályázati munka alapján az alábbi következtetéseket tehetjük (több közülük tankönyvi információk felülbírálatát vagy kiegészítését szolgálja):

- Az etiolált állapot, azaz protoklorofillid felhalmozódás és etioplasztisz képződés a természetes körülmények között fejlődő szervezetben is kialakul. A fák rügyeiben átmeneti, zárt termésekben állandósult állapotként.
- A nem levél szervezetben (valódi szárban, epikotilban, hipokotilban) a klorofill típusú pigmentek: protoklorofillid, klorofillid, klorofill-a jelentős része monomerként van jelen, és csak kevés protoklorofillid rendeződik nagy fotoaktivitású komplexekké.
- A komplexek az etioplasztisz belső membránjaiba épülve a prolamelláris testet alakítják ki, a monomer dominanciájú plasztiszokban főleg szimpla protilakoid membránok vannak, esetleg csak laza és kisméretű prolamelláris testek alakulnak ki.
- A komplexek kialakulása védelmet ad a fotooxidációs, fotodegradációs folyamatok ellen, a komplexbe épült NADPH egy részének a komplex (makrodomén) enzim stabilizálásában van szerepe.
- A komplexbe beépült extra NADPH protoklorofillid és klorofillid mikrociklust is működtet, ennek során a protoklorofillid fotoredukciója következtében kialakult NADP^+ visszaredukálódik NADPH-vá, és az újabb foton ismételt fotoredukciót vált ki, nem fotooxidációt.
- Azokban a szervezetben, ahol a monomerek dominálnak, ezek a ciklusok nem működnek, a fény már kis intenzitásokon is fotodegradációt vált ki.
- A prolamelláris test és a POR komplex képződése citokininnel mesterségesen serkenthető, nitrogénhiányos sejtekben viszont gátolt.
- Az etioplasztisz belső membránjai dinamikája következtében a pigmentek és komplexeik bonyolult átalakulási folyamatokban vesznek részt, ezt a következő sémában foglaltuk össze:



A sokféle szervben, szövetben, különböző körülmények között fejlődött plasztiszokban a protoklorofillid – klorofillid átalakulás új útvonalait sikerült leírunk. Ezeknek a működése a NADPH:protoklorofillid oxidoreduktáz (POR)enzim szerveződésének különböző szintjeitől függ. Az ábrában a számok a fluoreszcencia emissziós maximumot, a „P” protoklorofillidet jelöl.

Bebizonyítottuk, hogy a POR monomerje is aktív, ez borsóban a P636, más növényekben a P633 közvetlen átalakulását jelenti (A/1a és 1b utak).

Bebizonyítottuk, hogy a P628 a fototranszformáció után fel tudja tölteni a POR enzim aktív központját, és így regenerálni tudja a flash-fotoaktív komplexet (A/3 út).

Kimutattuk a POR monomer - dimer és oligomer dinamikus átalakulási útjait, vagyis annak a lehetőségét, hogy az etioplasztisz belső membránja dinamikus mozgásai révén ezek a komplexek egymásba tudnak alakulni (B/1 út).

A munka során számos új plasztisz típust írtunk le, amelyek kialakulása aláhúzza a plasztiszdifferenciálódás plaszticitását.

- A plasztiszdifferenciálódásnak nagymértékű szerv és szöveti specifitása van.
- Raktározó szervekben a sötétben fejlődő proplasztiszokban keményítő halmozódhat fel.
- Levél eredetű raktározó szervekben sötétben etioplasztiszok alakulnak ki, amelyek nagyméretű keményítő szemcsét tartalmaznak.
- Fejlődése kezdeti szakaszában fénynek kitett, később takarásban fejlődő szervekben kloro-etioplasztiszok alakulnak ki természetes körülmények között is (ilyen plasztiszokat korábban laboratóriumi körülmények között nevelt növényekben írtak le). Ezekben a plasztiszokban a tilakoid membránok közé prolamelláris testek épülnek be.
- A kloro-etioplasztiszoknak két típusa létezik:

Az egyik típusban a teljes fotoszintetikus apparátus épen marad: fény hatására azonnal beindulhat a fotoszintetikus aktivitás, és emellett folyik a rendkívül gyors protoklorofillid – klorofillid – klorofill-a átalakulás.

A másik típusban amely több hónapig takarásban fejlődő szervekben alakul ki, a klorofill egy speciális, tároló formában marad meg. Ha az ilyen növény fényre kerül, a fotoszintetikus aktivitás csak a fotoszintetikus apparátus komponenseinek *de novo* szintézise után indulhat be.

- A természetes körülmények között sötétben fejlődő szervekben az etioplasztiszoknak is két típusát írtuk le:

Az egyik típusban az etiolált csíranövényekéhez hasonló etioplasztiszok alakulnak ki, ezekben a prolamelláris testek kialakulása a jellemző.

A másik típusban (főleg szárazban vagy raktározó levelekben) az etioplasztiszok fejletlenek, prolamelláris test vagy nincs vagy csak kicsi és laza membránrendszer jellemzi. Az etioplasztiszok belső membránrendszere ilyenkor főleg protilakoid. Az ilyen típusú plasztiszokkal rendelkező szervek nem, vagy csak alacsony fényintenzitáson tudnak zöldülni.

- Skizogén kiválasztó szervekben és mirigyszőrökben is leírtuk a plasztiszok speciális differenciálódási útját, amelyben a tilakoid rendszer degradálódása, a fotoszintetikus aktivitás elvesztése és a kiválasztás metabolikus folyamatainak beindulása zajlik le párhuzamosan. A váladékanyagokat a differenciálódás korai szakaszaiban a plasztiszok belsejében található vezikulumok tartalmazzák.

- Kimutattuk a plasztiszok egymásba történő átalakulásának több útvonalát, ami a szervek autotróf metabolizmusának kialakulása szempontjából meghatározó jelentőségű.

10, A pályázati munkából készült publikációk

Impakt faktorral rendelkező nemzetközi folyóiratokban publikált cikkek:
(valamennyi esetben szerepel az OTKA megnevezése és a pályázat száma a
köszönetmondásban)

László Smeller, Katalin Solymosi, Judit Fidy, Béla Böddi (2003) Activation parameters of the blue shift (Shibata shift) subsequent to protochlorophyllide phototransformation.
Biochimica Biophysica Acta – Proteins and Proteomics **1651**, 130-138. (IF: 1.602)

Katalin Solymosi, Katalin Lenti, Beata Myśliwa-Kurdziel, Judit Fidy, Kazimierz Strzałka, Béla Böddi (2004) Hg²⁺ reacts with different components of the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase macrodomains.
Plant Biology **6**, 358-368. (IF: 1.582)

Katalin Solymosi, Krisztina Martinez, Zoltán Kristóf, Christer Sundqvist, Béla Böddi (2004) Plastid differentiation and chlorophyll biosynthesis in different leaf layers of white cabbage (*Brassica oleracea* cv. capitata).
Physiologia Plantarum **121**, 520-529. (IF: 2.017)

A. Kósa, Zs. Márton and B. Böddi (2005) Fast phototransformation of the 636 nm emitting protochlorophyllide form in epicotyls of dark-grown pea (*Pisum sativum* L.)
Physiologia Plantarum **124**, 132-142. (IF: 2.017)

Béla Böddi, Roland Loudeche and Fabrice Franck (2005) Delayed chlorophyll accumulation and pigment photoreduction in the epicotyls of dark-grown pea (*Pisum sativum*).
Physiologia Plantarum **125**, 365-372. (IF: 2.017)

Katalin Solymosi, Béla Böddi (2006) Optical properties of bud scales and protochlorophyll(ide) forms in leaf primordia of closed and opened buds.
Tree Physiology **26**, 1075-1085. (IF 2004: 2.46)

Katalin Solymosi, Károly Bóka, Béla Böddi (2006) Transient etiolation: protochlorophyll(ide) and chlorophyll forms in differentiating plastids of closed and breaking leaf buds of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*).
Tree Physiology **26**, 1087-1096. (IF 2004: 2.46)

Katalin Solymosi, Beata Myśliwa-Kurdziel, Károly Bóka, Kazimierz Strzałka, Béla Böddi (2006) Disintegration of the prolamellar body structure at high concentrations of Hg²⁺. *Plant Biology in press, after proof correction.* (IF 2004: 1.582)

Annamária Kósa, Zsuzsanna Márton, Katalin Solymosi, Károly Bóka, Béla Böddi (2006): Aggregation of the 636 nm emitting protochlorophyllide form into flash-photoactive, 644 and 655 nm emitting forms *in vitro*. *Biochimica et Biophysica Acta, Bioenergetics – in press, after proof correction.* (IF2004: 3.503)

Beata Myśliwa-Kurdziel, Katalin Solymosi, Jerzy Kruk, Béla Böddi, Kazimierz Strzałka: Protochlorophyll complexes with similar steady-state fluorescence characteristics can differ in fluorescence lifetimes. A model study in Triton X-100. *Journal of Photochemistry and Photobiology (submitted manuscript)*

Hazai publikációk

Ennek a kutatási programnak az eredményeit csak konferenciák kiadványaiban publikáltuk. Ezek közül ebbe a kategóriába tartozhatnak az Acta Biologica Szegediensis-ben vagy külön, ISBN számmal rendelkező kiadványok. A következő fejezetben a konferenciakiadványokban csillaggal jelölt publikációk tartozhatnak ide.

Nemzetközi konferenciákon történt részvétel (konferenciakiadvány) (Az előadások diáin vagy a posztereken feltüntettük az OTKA támogatását)

- Katalin Solymosi, Katalin Lenti, Beata Mysliwa-Kurdziel, Gusztáv Schay, Judit Fidy, Kazimierz Strzalka, Béla Böddi (2003) The effect of mercury on protochlorophyllide photoreduction and the subsequent reactions
Photochange – Photosynthesis in a Changing World Conference, Chania, Greece, 2003.05.27.-06.03.

- Annamária Kósa, Zsuzsanna Márton and Béla Böddi (2003) Aggregation of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase subunits gives protection against photooxidation damage
Photochange – Photosynthesis in a Changing World Conference, Chania, Greece, 2003.05.27.-06.03.

- Katalin Solymosi, Béla Böddi, Christer Sundqvist, Margareta Ryberg, Judit Fidy, László Smeller (2003) The effect of molecular environment on the activation volume and activation energy of the Shibata shift.

Joint AIRAPT-19 (International Association for the Advancement of High Pressure Science and Technology) & EHPRG-41 (European High Pressure Research Group) Conference, Bordeaux, France, 2003.07.07.-11.

- Katalin Solymosi, László Smeller, Judit Fidy, Béla Böddi (2004) High pressure : a tool to study volumetric changes during greening of etiolated leaves

13th International Congress of Photosynthesis, Montréal, Canada, 2004.08.29.-09.03.

- Katalin Solymosi, Béla Böddi, Margareta Ryberg, Christer Sundqvist, Judit Fidy, László Smeller (2004) Lipid environment has minor contribution in the molecular rearrangements during Shibata shift.

42nd European High Pressure Research Group Meeting, Lausanne, Switzerland, 2004. 09. 1-4.

- Béla Böddi (2005) Protochlorophyllide forms as photoreceptors and/or precursors in chlorophyll biosynthesis. (Invited lecture)

6th International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors in Photosynthetic Organisms September 11-16, 2005, Lucerne (Switzerland)

Hazai konferenciákon történt részvétel (kiadvány)

(Az előadások diáin vagy a posztereken feltüntettük az OTKA támogatását)

- Solymosi Katalin, Lenti Katalin, Beata Mysliwa-Kurdziel, Schay Gusztáv, Fidy Judit, Kazimierz Strzalka, Böddi Béla (2003) A higany hatása a protoklorofillid fotoredukciójára és az azt követő Shibata-féle eltolódásra

Magyar Biofizikai Társaság XXI. Kongresszusa, Szeged, 2003. 08.24-27.

- Solymosi Katalin, Böddi Béla, Christer Sundqvist, Margareta Ryberg, Smeller László, Fidy Judit (2003) A Shibata shift aktivációs paramétereinek meghatározása eltérő glicerinn koncentrációjú közegekben

Magyar Biofizikai Társaság XXI. Kongresszusa, Szeged, 2003. 08.24-27

- Böddi Béla (2003) A zöldülés és a plasztiszdifferenciálódás szervezettani és szövettani változatossága. (A NADPH:protoklorofillid oxidoreduktáz natív szerveződésének variációi.)
V. Magyarországi Fotszintézis Konferencia és Fotszintézis Iskola, Noszvaj, 2003.09.15-16.

- Márton Zsuzsanna, Kósa Annamária és Böddi Béla (2003) A fotokémiai aktivitás növekedése a POR alegységek makrodoménné váló szerveződése következtében.

V. Magyarországi Fotszintézis Konferencia és Fotszintézis Iskola, Noszvaj, 2003.09.15-16.

- Solymosi Katalin, Lenti Katalin, Beata Mysliwa-Kurdziel, Schay Gusztáv, Fidy Judit, Kazimierz Strzalka, Böddi Béla (2003) A Hg²⁺ hatása a NADPH:protoklorofillid oxidoreduktáz makrodomének szerveződésére és működésére

V. Magyarországi Fotszintézis Konferencia és Fotszintézis Iskola, Noszvaj, 2003.09.15-16.

- Tóth Szabolcs, Imre Kornél, Vági Pál, Solymosi Katalin, Böddi Béla, Kristóf Zoltán (2004) Plasztiszok membránrendszerének tomográfiás vizsgálata

Magyar Mikroszkópos Társaság Konferenciája, Balatonalmádi, 2004. 05. 27-29.

- Solymosi Katalin, Martinez Krisztina, Kristóf Zoltán, Christer Sundqvist, Böddi Béla (2005) Hosszantartó etiolált állapot hatása a káposztafej (*Brassica oleracea* L. cv. capitata) belsejében és a különböző levélrétegek zöldülése

VIII. Magyar Növényélettani Kongresszus – VI. Magyarországi Fotoszintézis Konferencia, Szeged, 2005. 08. 22-25.

- Kósa Annamária és Böddi Béla (2005) A protoklorofillid fotoredukciójának új útvonala: a monomer NADPH:protoklorofillid oxidoreduktáz enzimkomplex flash-fotoaktivitása
Magyar Biofizikai Társaság XXII. Kongresszusa, Debrecen, 2005. 06. 26-29.

- Solymosi Katalin, Martinez Krisztina, Kristóf Zoltán, Bóka Károly, Böddi Béla (2005)
A fény szabályozó szerepe a plasztiszok differenciálódásában a természetben
Magyar Biofizikai Társaság XXII. Kongresszusa, Debrecen, 2005. 06. 26-29.

- Katalin Solymosi (2005) Plant Porphyrins *in vivo*: Native arrangements and the functions of protochlorophyllide complexes
Pharmacy: Smart molecules for therapy – conference on the occasion of the semi-centennial of the Semmelweis University, Faculty of Pharmacy, Budapest, 2005. 10. 12-14.

* Katalin Solymosi, Krisztina Martinez, Zoltán Kristóf, Christer Sundqvist, Béla Böddi (2005)
The effect of prolonged etiolation inside the cabbage (*Brassica oleracea* L. cv. capitata) head and the greening of the different leaf layers. *Acta Biologica Szegediensis* 49 (1-2) 227-228.

* B. Böddi (2005) Tissue- and organ specific plastid differentiation in various plant species.
Acta Biologica Szegediensis 49, 185-186.

* A. Kósa and B. Böddi (2005) Dynamic interconversion and phototransformation processes of protochlorophyllide complexes during greening
Acta Biologica Szegediensis 49, 219-220

* A. Skribanek, K. Solymosi and B. Böddi (2005) Special features of the greening of *Ginkgo biloba* L.
Acta Biologica Szegediensis 49, 221-222

- Solymosi Katalin, Bóka Károly, Böddi Béla (2006) Plasztiszfejlődés vadgesztenye (*Aesculus hippocastanum*) levélrügyeiben
Magyar Mikroszkópos Társaság Konferenciája, Balatonalmádi, 2006. 05. 18-20.

* Kósa Annamária, Preininger Éva és Böddi Béla (2006): Különböző mértékű nitrogénhiány hatása szervtenyészetben fejlődött borsó (*Pisum sativum* L.) száruk etioplasztiszainak fejlődésére. In: XII. Magyar Növényanatómiai Szimpózium ed.: Mihalik Erzsébet.
JATE Press, Szeged, ISBN: 963 482 767 5, pp. 84-88.

* Solymosi Katalin, Bóka Károly, Kristóf Zoltán, Böddi Béla (2006) Etioplasztiszok és etiokloroplasztiszok kialakulása természetes körülmények között fejlődő szervekben. In: XII. Magyar Növényanatómiai Szimpózium Sárkány Sándor emlékére, 2006. június 22.-23.) (Ed. E. Mihalik), JATE Press, Szeged, ISBN 963-482-7675, pp 94-98.

* Szenzenstein Andrea, Solymosi Katalin, Bóka Károly, Böddi Béla (2006) Plasztisz differenciálódás *in vitro* kultúrában létrehozott burgonya mikrogyümölcsben. In: XII. Magyar Növényanatómiai Szimpózium Sárkány Sándor emlékére, 2006. június 22.-23.) (Ed. E. Mihalik), JATE Press, Szeged, ISBN 963-482-7675, pp 62-66.

* Péter Gyöngyi, Solymosi Katalin, Böddi Béla (2006) Plasztisz típusok articsóka (*Cynara scolymus* L.) fiatal virágzatában. In: XII. Magyar Növényanatómiai Szimpózium Sárkány Sándor emlékére, 2006. június 22.-23.) (Ed. E. Mihalik), JATE Press, Szeged, ISBN 963-482-7675, pp 89-93.

* Vitányi Beáta, Solymosi Katalin, Hideg Éva, Böddi Béla (2006) Etioplasztiszok a fényen nőtt napraforgó (*Helianthus annuus* L.) termésfal által takart sziklevelében. In: XII. Magyar Növényanatómiai Szimpózium Sárkány Sándor emlékére, 2006. június 22.-23.) (Ed. E. Mihalik), JATE Press, Szeged, ISBN 963-482-7675, pp 73-77.

* Skribanek Anna, Solymosi Katalin, Hideg Éva, Böddi Béla (2006) A páfrányfenyő (*Ginkgo biloba* L.) szár zöldülésének anatómiai sajátosságai. In: XII. Magyar Növényanatómiai Szimpózium Sárkány Sándor emlékére, 2006. június 22.-23.) (Ed. E. Mihalik), JATE Press, Szeged, ISBN 963-482-7675, pp 249-253.

2006-ban és 2007-ben további 4-5 publikáció várható nemzetközi folyóiratokban, amelyek kísérletes munkáját ennek a pályázatnak a keretében végeztük. Ezt fel fogjuk tüntetni a publikációkban.