

Az extrémén kiszáradástűrő *Porella platyphylla* újrantedvesedést követő regenerációjának stresszfiziológiai vizsgálata a kiszáradás intenzitásának függvényében, specifikus inhibitorok alkalmazása mellett

OTDK-dolgozat

XXXII. OTDK Biológia Szekció

Készítette: Sütő Szidónia, III. évf. Biológia BSc

Eszterházy Károly Főiskola, Növényélettani Tanszék



Témavezető: dr. habil. Marschall Marianna, főiskolai tanár

Eszterházy Károly Főiskola, Növényélettani Tanszék

EKF, TTK, Eger 2015

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
1. BEVEZETÉS, A TÉMA TUDOMÁNYOS HÁTTÉRÉNEK ÁTTEKINTÉSE	3
1.1. A vegetatív kiszáradástűrés (DT) előfordulása a fotoszintetizáló szervezetek körében ..	3
1.2. A DT mohák előfordulása, jellemzői, a DT fiziológiai és ökológiai típusai az edényesekben és a mohákban	3
1.3. DT moha és a DT zárwatermő modell közötti különbségek.....	5
1.4. Mohafajok fotoszintetikus és egyéb fiziológiai válaszai a kiszáradás és újranedvesedés során, védelmi mechanizmusok a regeneráció során	7
1.5. Fényvédelmi mechanizmusok, az NPQ	8
2. CÉLKITŰZÉSEK	12
3. A TÉMAVÁLASZTÁS INDOKLÁSA	12
4. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	13
4.1. A vizsgált növény.....	13
4.2. Alkalmazott mérési módszerek, eljárások	13
4.2.1. Klorofill-fluoreszcencia indukció a PSII és PSI aktivitás mérésére.....	13
4.2.2. Porella-kivonat készítése	15
4.2.3. Membránpermeabilitás vizsgálata	15
4.2.4. Prolintartalom meghatározása	15
4.2.5. Összfehérjetartalom meghatározása	16
4.2.6. Összoldható szénhidrát-tartalom meghatározása.....	16
4.2.7. Fruktántartalom meghatározás	16
4.2.8. Ozmotikus potenciál meghatározása	16
4.2.9. Statisztikai analízis	17
4.2.10. Stressztényezők hatásának monitorozása sejttani, fénymikroszkópos vizsgálatokkal	17
4.2.11. Különböző mértékű 1-hetes kiszáradás után újranedvesedést követő regeneráció stresszfiziológiai vizsgálata, specifikus inhibitorok alkalmazása mellett. Kísérletterv.....	17
5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	18
6. ÖSSZEFOGLALÁS	33

1. BEVEZETÉS, A TÉMA TUDOMÁNYOS HÁTTÉRÉNEK ÁTTEKINTÉSE

1.1. A vegetatív kiszáradástűrés (DT) előfordulása a fotoszintetizáló szervezetek körében

A kiszáradástűrés (DT=desiccation tolerance) sok élőszervezet jellemzője, több mint 300 éve kutatják (Alpert 2000; Vicré *et al.* 2004). Növényekben a DT gyakran a reprodukatív struktúrák (pollen, spórák, magvak) (Alpert 2006; Wood 2007) jellemzője. A vegetatív részek, szövetek (kriptogámokban a nem valódi szövetes struktúrák) kiszáradástűrése a növényvilágban ritka, főleg algákban, zuzmókban és mohákban fordul elő (Leprince & Buitink 2010). Az edényesek között a valódi DT növények mindössze 0.15%-ban fordulnak elő. 2001-ig körülbelül 350 kiszáradástűrő fajt írtak le (Tuba 2001). A nyitvatermők között nem ismerünk egyetlen kiszáradástűrőt sem. A harasztok között a korpafüveknél 2 genuszban, a páfrányoknál 19 genuszban találhatók kiszáradástűrő fajok. A zárvatermő kétszikűek között 5 család 20 feletti ismert fajszámmal, az egyszikűeknél 4 család (*Cyperaceae*, *Liliaceae*, *Poaceae*, *Velloziaceae*) számos fajával képviseli a kiszáradástűrőket. A filogenetikai analízisek alapján a vegetatív részek kiszáradástűrése ősi módon létezett pl. a mohákban, mint ősi szárazföldi növényekben. Mivel a vegetatív DT nagyon ritka az edényesekben, feltehetőleg az edényes növények különböző csoportjaiban függetlenül fejlődött ki (Oliver *et al.* 2000a; Wood & Oliver 2004).

1.2. A DT mohák előfordulása, jellemzői, a DT fiziológiai és ökológiai típusai az edényesekben és a mohákban

200 feletti a DT mohajok száma (Stark *et al.* 2013). A mohák esetében a DT-t egy olyan képességként definiálták (Alpert 2000), amelynek segítségével a belső vízpotenciál egyensúlyba kerülhet a mérsékelten száraz levegővel ($\leq 50\%$ RH), amely ≤ -100 MPa (gyakran -400 és -100 MPa közötti, esetenként -600 MPa is lehet) vízpotenciál értékhez tartozó deszikkációt is jelenthet, majd a rehidráció során a normál anyagcsere funkciók helyreállnak. Annak ellenére, hogy a DT gyakori és nagyon jellemző vonása a moháknak, nem egyetemes a csoport különböző tagjainál (Proctor *et al.* 2007; Wood 2007). A DT mohák ökológiai tartománya szűk és marginális; főleg olyan élőhelyeken lelhetők fel, amelyekben a víz elérhetősége nagyon korlátozott (Alpert 2000). Sok arid és szemi-arid ökoszisztémában a vegetatív borítás nagyon ritka. A nyitott élőhelyek az ilyen területeken általában DT mohákkal, cianobaktériumokkal, gombákkal, zöld algákkal és zuzmókkal fedettek, amelyek a kriptobiotikus kéreg fő komponensei (Belnap & Lange 2003; Li *et al.* 2003). Nagyon sok kutatás folyik a kriptobiotikus kéreg arid régiókban betöltött ökológiai szerepének feltárására. Ezen szerepek között van a talajerózió csökkentése, a víz beszívargásának a javítása, a szén-asszimilációban és a nitrogén-fixációban betöltött funkció (Belnap *et al.* 2004;

Elbert *et al.* 2009; Li 2012). A kérgek különböző típusai között, a mohakéreg megjelenése jó indikátora egy stabilabb, későbbi szukcessziós fázisban lévő élőhelytípusnak (Zhang *et al.* 2009). A sivatagi környezetben a mohakéreg gyakran vannak kitéve a vízvesztés, a kiszáradás és az újranedvesedés ciklusainak (Charron & Quatrano 2009; Pressel & Duckett 2010; Xu *et al.* 2009). A DT növényekkel kapcsolatos vizsgálatok során gyakran használják a fotoszintézis jellemzőit, mint a kiszáradás és a regenerálódás mutatóiként. A fotoszintetikus apparátus és a klorofillok kiszáradás alatti megőrződése egy kritérium a DT növények csoportjának 2 altípusra, homoioklorofillos (HDT) és poikiloklorofillos (PDT) kiszáradástűrő növényekre való osztására (Toldi *et al.* 2009). Taxonómiaiilag a PDT altípus az egyszikűek közötti előfordulásra korlátozódik. Pl. a PDT egyszikű, a *Xerophyta scabrida* a klorofillok és a tilakoidok elvesztését mutatja kiszáradás során (Tuba *et al.* 1993a,b). Ellentétben a HDT kétszikű *Haberlea rhodopensis*-sel, amely megtartja az összes klorofilját és a fotoszintetikus proteinek a kiszáradás alatt (Georgieva *et al.* 2007; 2009). Másik tanulmány szerint (Markovska *et al.* 1994) a *H. rhodopensis* a tilakoidok egy részét elveszti a kiszáradás során, de megtartja az összes klorofilját. A HDT újräledő *Myrothamnus flabellifolia* a klorofiljainak megközelítőleg az 50%-át elveszti, de megörzi a tilakoidjait a dehidráció során (Farrant *et al.* 1999). Van néhány faj, amely köztes stratégiát mutat (Farrant *et al.* 2008). Ezért még a DT edényes növények között is különböző stratégiák vannak a kiszáradás megközelítésére.

A DT mohák HDT altípusúak, amely azt jelenti, hogy a klorofillok és a fotoszintetikus apparátus megörzése a kiszáradás során a DT mechanizmus része (Toldi *et al.* 2009). Jelenleg, azonban kevés információ áll rendelkezésre a klorofillok és a fotoszintetikus proteinek változásairól a DT-mohákban, kiszáradás alatt. Az edényes HDT növényeknél némelyik megtartja kiszáradás során a tilakoidális protein komplexeit, némelyik egy részét elveszti, és van, amelyik köztes válaszokat mutat dehidráció során. Li *et al.* (2014) szerint a sivatagi élőhelyről származó *Bryum argenteum* DT lombosmoha klorofil tartalma szinte változatlan (mindössze 4.23%-os csökkenés az összklorofil-tartalomban és 6.25%-os csökkenés a klorofil a/b arányban) a hidratált és a majdnem teljesen kiszáradt állapotban. A kiszáradás során viszont a tilakoid protein komplexeinek egy részét elveszti (újränedvesedés során ezek reorganizálódnak), határozottan kevesebb tilakoid látható, a gránum tilakoidok egy része rendezetlen, kisebb és kevesebb keményítő, valamint jelentősen több ozmiofil szemcse jelenléte jellemző. A *Tortula ruralis*-ra, és a *Physcomitrella*-ra vonatkozóan is hasonló adatok lelhetők fel a szakirodalomban (Cui *et al.* 2012; Tuba *et al.* 1996). A *B. argenteum*-ban a tilakoid protein komplexek mennyisége, beleértve a PSI monomert, PSII szuperkomplexet

(PSII Core komplex CP47, CP43 és a PsaA/B alegységeinek a mennyisége csökken), a PSII monomert és az LHCII-t, fokozatosan csökken a kiszáradás során. A tilakoid protein komplexek mennyisége gyorsan növekszik a fényen történő újrandedvesedés során, és az első 10 percben eléri a kiszáradás előtti szintet, a sötétben viszont lassan növekszik és alacsonyabb értéket ér el. Ha a *B. argenteum* kiszáradástűrése konstitutív, a tilakoid protein komplexeknek intaktaknak kellene maradniuk. Viszont ennél a fajnál a kiszáradás során a tilakoid protein komplexek mennyisége csökken, más részük intakt marad, amely felelős lehet az újrandedvesedés korai szakaszában a fotoszintézis reaktivációjáért, s az újrandedvesedés további szakaszai során a „maradék” tilakoid protein komplexek is reorganizálódnak a fényen. A *B. argenteum*-ban a kloroplasztisz ultrastruktúrájában és a tilakoid protein komplexekben tapasztalható változások arra engednek következtetni, hogy a HDT mohák stratégiája is számos köztes jelleget mutathat. A *Physcomitrella*-ban sok fotoszintézisben résztvevő fehérje leszabályozódik (down-regulated) a kiszáradás során (Cui *et al.* 2012). A szárazföldi *Nostoc flagelliforme*-ben is a fehérjék reszintézise szükséges a fotoszintézis rehidráció során történő újraélesztéséhez.

A DT mohák között 2 ökológiai stratégia különíthető el (Stark *et al.* 2013; Oliver *et al.* 1998). Azok a DT mohák, amelyek rendkívül gyors kiszáradást túlélve, újrandedvesedés során mindössze kisebb károsodásokat mutatnak és javítanak az ún. konstitutív DT növények (CDT). Azok a DT mohák, amelyeknél gyors kiszáradást követően jelentős károsodások merülnek fel az újrandedvesedéskor, ugyanakkor viszonylag károsodás nélkül újraélednek a lassú kiszáradást követően, az induktív DT (IDT) csoportba tartoznak (Mayaba *et al.* 2001; Beckett *et al.* 2005). Valószínűleg a DT mohák között vannak olyanok, amelyek a CDT és az IDT stratégiák között köztes stratégiát képviselnek (Wood 2007). A legújabb álláspont szerint a DT mohákban egy hatékony konstitutív védelmi rendszerhez kapcsolódnak a rehidráció-indukált aktív helyreállítási mechanizmusok (Proctor *et al.* 2007; Oliver *et al.* 2010).

A ma élő (DT) mohák korántsem nevezhetők primitívnek, hanem végtermékei egy több mint 400 millió éves szeparált evolúciós fejlődésnek, melynek során a gametofiton-domináns morfológiai felépítésüknek megfelelő, legoptimálisabb stratégia alakult ki számukra.

1.3. DT moha és a DT zárvatermő modell közötti különbségek (Oliver *et al.* 2000a,b)

Az edényes kiszáradástűrők nem élnek túl a kiszáradást, ha az túl gyors (rövidebb, mint 12 h), mivel „időigényes”, indukálható sejtvédelmi mechanizmusok (pl. fehérjeszintézis) szükségesek a kiszáradástűrésük kialakulásához. A DT mohák rövid (akár 1 h, de átl. 3 h) idő alatt bekövetkező kiszáradást is képesek elviselni, és újrandedvesedés után teljesen helyreállítani az anyagcseréjüket. A DT mohákban kiszáradás során gyors vízvesztés (12 h-n

belüli) jellemző, amit a konstitutív védelem megenged, majd rehidráció indukált aktív regeneráció és javító mechanizmus kapcsol be az újranedvesedés során. A zárwatermők induktív, ABA-kontrollált, sejtvédelmi mechanizmusa csak lassú vízvesztés (12h-n túli) során aktiválódik, majd újranedvesedéskor a hosszabb időt igénylő helyreállítási folyamatok következnek. Az edényes növények adaptálódtak a kiszámíthatatlanul és változó mennyiségben rendelkezésre álló víz hasznosításához (homoiohidria, belső vízvezetés, kutikularizált epidermisz, szabályozott vízleadás). A poikilohidrikus mohák alternatív stratégiával rendelkeznek. Akkor fotoszintetizálnak, növekednek, amikor a víz a rendelkezésükre áll, kiszáradáskor pedig felfüggesztik metabolikus aktivitásukat. Ez sokkal inkább szárazság elkerülési stratégia. A DT mohák ekvilibriumba tudnak kerülni a 20-50%-os RH-jú levegővel (20 °C-on), ami -400- -100 MPa erősségű vízhiány tolerálását jelenti (RWC_{dw} 5-10%). Az edényes DT-k 95%-os RH-jú levegővel (20 °C-on), 30-40% -os RWC mellett kerülnek equilibriumba, ami „mindössze” -7- -9 MPa tolerálását teszi lehetővé (Proctor *et al.* 2007). A DT edényesek többszintű, többféle vízhiányt képesek tolerálni, mint a mezofita edényesek. A DT mohák kiszáradásuk során átmennek azokon a vízstressz szinteken, amelyeken a DT edényesek sikeresek, de csak rövid ideig érintik e vízállapotokat, azaz csak átmenetileg néznek szembe a problémával, hogy vízhiány alatt folytassák az anyagcseréjüket. A DT mohák sejtjeinek 2 stabil állapota van: az egyik a teljes turgor állapot, a másik a kiszáradt állapot. A kiszáradástűrésüket nagyban befolyásolja e két állapotban eltöltött idő hosszúsága, a kiszáradás intenzitása (sebessége és mértéke), valamint az ezzel társuló hőmérsékleti és fény viszonyok. Stratégiájuk alapvető különbsége az edényes újraéledő DT-khez viszonyítva, hogy egy aktív rehidráció-indukált javító és regenerációs mechanizmus létezik bennük, amely háttérében nem a jól elkülöníthető tolerancia gének transzkripciós aktivitása áll, hanem egy sokkal gyorsabb transzlációs kontroll. Valójában ez egy ABA-független konstitutív védelmi rendszer, amely magába foglal néhány kulcs elemet az edényesekben jellemzett indukálható rendszerből. Ennek a konstitutív rendszernek a jelentése, hogy előre expresszál védő fehérjéket, mRNS-protein komplexeket készít előre, és ezek szintjét a kiszáradás során fenntartja. Továbbá konstitutív vonásként értékelhető az is, hogy az ozmotikusan aktív szénhidrátok (elsősorban szacharóz) mennyisége jelentős, szintjük gyakorlatilag nem változik a kiszáradás és az újranedvesedés során (Marschall *et al.* 1998).

1.4. Mohafajok fotoszintetikus és egyéb fiziológiai válaszai a kiszáradás és újranedvesedés során, védelmi mechanizmusok a regeneráció során

A poikilohidrikus mohák akkor fotoszintetizálnak, növekednek, amikor a víz a rendelkezésükre áll, kiszáradáskor pedig felfüggesztik metabolikus aktivitásukat (Proctor & Pence 2002). A HDT mohák fotoszintetikus apparátusa kiszáradás során megőrződik (újabb kutatások többféle változást is detektálnak ld. fentebb), és a fotoszintetikus aktivitás gyors és teljes regenerálódását teszi lehetővé az újranedvesedés során (Deltoro *et al.* 1998a,b; Marschall & Proctor 1999; Csintalan *et al.* 1999). A mohák vízhiányra adott fotoszintetikus sejtválaszai – precízen meghatározott víztartalomra vonatkozó paraméterek használata esetén – megegyeznek az edényesekével (Proctor 2000). A mohák jelentős mennyiségű külső kapilláris vizet tartalmaznak, amely fiziológiailag fontos. Az anyagcsere folyamatok jellemzőinek az edényesekkel történő összehasonlíthatóságához alapvető a teljes turgorhoz tartozó víztartalom (WC) ismerete, amely csak kísérleti úton, minden faj esetében egyedileg meghatározott pv-görbékből származtatható (Marschall 2009). A teljes turgorhoz viszonyítva adjuk meg többi víztartalomra vonatkozó paraméterüket is. Kiszáradás során a mohák először a külső, jelentős mennyiségű kapilláris vizüket, majd az apoplazmatikus vizet veszítik el. Amíg a kapilláris és az apoplazmatikus vízfrakciókkal rendelkeznek, addig a sejtjeik nem kerülhetnek vízhiánystressz állapotába, nem csökken a fotoszintetikus aktivitásuk. Ha elveszítik a nagy mennyiségű és fiziológiailag fontos felületi és apoplazmatikus vizüket, a sejtjeikben a szimplazmatikus víz is veszélybe kerül, s a vízhiány mértékének növekedésével az edényesekre jellemző fotoszintetikus válaszokat mutatják vízhiány alatt.

Az adott mohafajra jellemző CDT és IDT mechanizmusok hatékony működésén kívül a kiszáradás gyorsasága, intenzitása, a kiszáradt állapotban eltöltött idő relatív hosszúsága, valamint az ezzel társuló fény és hőmérsékleti viszonyok határozzák meg, hogy az újranedvesedés során beinduló fotoszintetikus aktivitás regenerációja milyen mértékű és pontosan mennyi időt vesz igénybe. A kiszáradt állapotban töltött idő hosszának növekedésével nő az újranedvesedés során a teljes regenerációhoz szükséges idő, ugyanakkor a regeneráció mértéke csökken. A DT mohafajokban a légzés, a fotoszintézis és a fehérjeszintézis percek vagy legfeljebb 1 vagy 2 órán belül helyreáll. A sejtciklus, a tápanyagtranszport és a citoskeleton regenerációja legalább 20 vagy ennél is több órát igényel (Pressel & Duckett 2010). Ahhoz, hogy a kiszáradás és az újranedvesedés egymást követő ciklusait a sejtek túléljék, pozitív szénmérleg szükséges. A kiszáradást követően a növekedés beindulásához pedig folyamatosan nedves periódusú napokra van szükség. A DT mohák regenerációjának megvalósulását zömében biztosító CDT mechanizmusokhoz tartozik,

hogy a kiszáradást megelőzően expresszálnak védő fehérjék (pl. dehidrinek, rehidrinek), előre készülnek mRNS-fehérje komplexek, melyek szintje a kiszáradás során szinte állandó. Az is konstitutív vonás, hogy a kompatibilis ozmolitként ható szerves vegyületek közül a polialkoholok, és/vagy szacharóz, egyéb szénhidrátok megtalálhatók a citoplazmájukban. A nem redukáló szacharóz, nagy mennyiségben fordul elő a citoplazmában, és mennyisége gyakorlatilag nem változik a kiszáradás és az újranedvesedés során. A kompatibilis ozmolitok elsődleges funkciója az ozmoreguláció, a turgor fenntartása, de emellett részt vesznek a makromolekulák (elsősorban fehérjék), a membránok, a sejt struktúrájának a kiszáradás alatti stabilizálásában, a ROS elemeinek az eltávolításában. A DT mohák kiszáradás nyomán kialakuló védelmi mechanizmusainak leglényegesebb elemei közé tartozik a termális energia disszipáció (kiugróan magas NPQ értékekkel) és a glutation-aszkorbát cikluson alapuló antioxidáns védelmi rendszer.

Az ABA az eddigiekben vizsgált mohafajok esetén is a magasabbrendű növényekben megismert hatásokat váltja ki: növeli a stressztűrő képességet és növeli a stressz toleranciát (Werner *et al.* 1991; Hellwege *et al.* 1994; Pence *et al.* 2005). Szerepe feltehetőleg a moháknál is komplex. A vízhiányra adott válaszreakciók indukálásában, a kiszáradástűrés fokozásában játszik szerepet.

1.5. Fényvédelmi mechanizmusok, az NPQ

A fény fluktuáló természete egy dinamikus fényvédelmi mechanizmus meglétét teszi szükségessé. A fotoszintetikus apparátuson belül a legbiztonságosabb, és a legrugalmasabb módja a klorofillok által abszorbeált felesleges gerjesztési energia elvezetésének a hő energia formájában történő leadás. Az NPQ a gerjesztett szinglet állapotú klorofillról ($^1\text{Chl}^*$) történő hőelvezetésből áll. Kinetikusan az NPQ egy komplex folyamat, a biokémiai, biofizikai, fiziológiai és az ökológiai jellemzése az elmúlt 20 évben intenzíven folyt. Alapvetően 3 komponens vesz részt az NPQ regulációjában: (1) a tilakoid membrán lumen és a sztróma oldala között létrejövő protongradiens (ΔpH), amely a fotoszintetikus protonpumpa által generálódik; (2) a violaxantin-ciklus aktivitása, működése során keletkező zeaxantin; (3) a PsbS protein (García-Plazaola *et al.* 2012). A növények meglévő fényvédelmi mechanizmusai rövid- és hosszútávú válaszként képesek. A leggyorsabb közülük az NPQ, mely másodpercek alatt képes aktiválódni. Erős megvilágítás során, perces időskálát igénybe véve, zeaxantin szintézis aktiválódik (zeaxantin képződik violaxantinból), a VDE (violaxantin de-epoxidáz) aktiválódásával (Arnoux *et al.* 2009). Ezek mellett a zeaxantin késlelteti az NPQ relaxációját sötétben, közvetlen szerepet játszik a ROS eliminálásában (Havaux *et al.* 2007). Hosszú távon a növény egy akklimációs válasz részeként, génexpressziós modulációval,

proteintartalom és a fiziológiai paraméterek megfelelő változtatásával is tud válaszolni a fényintenzitás változására (Eberhard *et al.* 2008). Pl. a CO₂-fixáló enzimek koncentrációjának a növelése a HL-aklimált növényekben, vagy egy másik válaszreakció a PSII antenna méret és egységnyi felületre eső pigmenttartalom csökkentése a gerjesztési energia megfelelő hasznosítására.

A DT növények gyors termális energia disszipációt indukálnak. Annak ellenére, hogy a mohanövények fényvédelmi mechanizmusai közül sok közös a magasabbrendűekével, vannak alapvető különbségek a mohák fényvédelmében. A mohák esetében a speciális epidermális védőrétegek hiányoznak, jóllehet rendelkezhetnek különleges felületnagysággal, egyben védő (pl. hialin szőrökkel) struktúrákkal. Éppen ezért a moháknak kifinomultabb, komplexebb sejtszintű fényvédelemmel kell operálniuk, mint a magasabbrendű növényeknek. Más tekintetben az alga ősökben megtalálható mechanizmusokat, amelyeket az edényes növények az evolúciójuk során elvesztettek, a mohák megtartották (pl. LHCSR protein kapcsolt termális energia disszipáció). Sok mohafaj képes kiszáradása, újranedvesedése, fagyása és kiolvadása során fényabszorpciót megvalósítani az energiadisszipáció újabb mechanizmusainak eredményeképpen. Tekintettel arra, hogy nagyon sok mohafaj rendkívül stresszűs környezetben él (a forró sivatagoktól a fagyott alpesi élőhelyekig magas UV-B-sugárzásnak kitéve), nem meglepő, hogy ehhez társultan hatékony fényvédelmi stratégiával rendelkeznek. Jóllehet az edényes növényekkel sok közös fényvédelmi mechanizmusuk van, vannak kulcsfontosságú különbségek is a moháknál. Edényes növényekben az NPQ a PSBS protein aktivitásán alapul, a *Chlamydomonas reinhardtii* zöld algában pedig egy másik proteint az LHCSR-t (LHC-szerű polipeptid) (Peers *et al.* 2009) igényli. Egyelőre a *Physcomitrella patens* nevű moha az egyetlen ismert/leírt élőszervezet, amelyben mindkét említett protein jelen van és aktív az NPQ kiváltásában, különlegessé és érdekessé tévén ezt a fajt a benne lévő védőmechanizmus feltárására, vizsgálatára (Gerotto *et al.* 2012).

Az NPQ-nak két fő komponense van, az energiafüggő (qE) kioltás és az inhibíciós komponens (qI). A qE a lumensavanyodástól függ, és másodpercek alatt kifejlődik a fényintenzitás növekedése során. A qE 1-2 perc alatt relaxálódik a sötétben (Horton *et al.* 1996). A lassú komponens, a qI nemcsak 1 mechanizmustól függ. Részben a PSII fotoinhibíciójának köszönhető, de ezen kívül a zeaxantin akkumulációjának is (Gerotto *et al.* 2012) A zeaxantin akkumulációtól függő részt qZ-nek is nevezik újabban, vagy NPQAZ-nak, hogy megkülönböztessék a fotoinhibíciós komponenstől. Azt is meg kell említeni, hogy a zeaxantin jelenléte szintén erősíti qE komponenst (Horton *et al.* 1996; Horton & Ruban 2005).

Az edényes növényekben, a qE indukciója a PSBS jelenlétére támaszkodik (PSII S alegysége), amely egy fénygyűjtő komplexszerű (LHC-szerű) fehérje, amelynek az aktiválódását a lumensavanyodás váltja ki 2 glutamát reziduum protonálódásán keresztül. Ha a PSBS aktiválódik, a klorofill gerjesztett állapotainak élettartama lecsökken az antenna rendszer pigmentkötő alegységében, a PSII alegységek külön domének formálása miatti szegregációja után a gránumtilakoidokban (Johnson *et al.* 2011).

A *Physcomitrella patens* képes az NPQ szintet modulálni a PSBS és/vagy az LHCSR fehérjék koncentrációjának a regulálásával. Pl. *Chlamydomonas reinhardtii*-ban az LHCSR tartalomban bekövetkezett növekedés volt a felelős a magasabb NPQ kialakulásáért a HL-kezelt sejtekben (Peers *et al.* 2009). *Arabidopsis*-ban a PSBS akkumulációja (overexpresszált növények) az NPQ intenzitására hatással van. Amely növényben a PSBS és az LHCSR mennyisége lecsökkent, nemcsak hogy csökkent NPQ-val rendelkeztek, de az effektív kvantumhatásfokuk is lecsökkent (Gerotto *et al.* 2012). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az NPQ modulálásának kapacitása fontos a mohákban az intenzív megvilágításra adott válaszreakció kialakításában, az extra gerjesztési energia okozta károk elkerülésére. Ez különösen fontos, ha tekintetbe vesszük azt, hogy az NPQ egy gyorsan aktiválódó védőmechanizmusként ismert, *Arabidopsis*-ban a fényintenzitás gyors változásaira adott válaszban tölt be jelentős szerepet és kevésbé releváns az intenzív, de állandó megvilágításnak kitett növények fényvédelmében (Kulheim *et al.* 2002).

A magasabbrendű edényes növényektől eltérően, eddig vizsgált néhány moha, nem redukálja az antenna rendszer méretét erős megvilágítás hatására. A lehetséges magyarázat erre, hogy a mohák poikilohidrikus növények és intenzív megvilágítás hatására kiszáradnak, amely egyébként is blokkolja a fotoszintetikus aktivitásukat, az aktiválódó erős termális disszipáló mechanizmus ugyanakkor minden felesleges gerjesztési energiát elvezet (Heber *et al.* 2006b; Heber 2008). Mivel a mohák mindig nagy antenna rendszert tartanak fenn, ez is egy lehetséges magyarázattal szolgálhat az intenzív NPQ jelenlétére (pl. *Physcomitrella*-ban). Mindkét, az LHCSR és a PSBS-alapú NPQ mechanizmus egyidejű megléte képessé teszi őket a hatékony fényvédelemre az alacsony fényhez adaptálódott fotoszintetikus apparátussal rendelkező fajokban is, még folyamatosan erős megvilágítás esetén is. A mohákban a PSBS és az LHCSR szimultán és egymástól függetlenül is aktív.

A megnövekedett termális energia lecsengetés kiszáradás során a változó fluoreszcencia (F_v) elvesztésében és az alapfluoreszcencia (F_0) kioltásában nyilvánul meg.

A zeaxantinfüggő termális energia disszipáció, a mai ismeretek szerint, a PSII antenna rendszerében aktiválódik extra gerjesztő fényenergia esetén, a PsbS fehérje protonálódása

által (Heber *et al.*, 2006b). (Ez akkor fordul elő, amikor az alternatív elektrontranszport folyamatok lecsökkentik az intratilakoidális pH-t azon célból, hogy a protein protonálódás bekövetkezhesen.) Hidratált állapotban ez a zeaxantinfüggő mechanizmus irányítja a termális energia disszipációt. Ha már egyszer a mechanizmus aktiválódott, a zeaxantintartalmú energia lecsengető centrumok működni fognak, még kiszáradás után is. A kiszáradást megelőző sötétkezelés, a fény hiánya viszont a hidratált moháknál a korábban aktív zeaxantinfüggő energia disszipáció inaktiválását eredményezi. Az erős fénynek kitett mohák kiszáradásfüggő fluoreszcencia csökkenésének mértéke a vízvesztés gyorsaságától függ. A lassú, kíméletes kiszáradás nagyobb fokú aktiválódást tesz lehetővé a mechanizmusnak, mint a gyors. Ebből az következik, hogy a mechanizmus aktiválódása időfüggő, amely háttérben speciális konformációs változások állhatnak.

Kiszáradásuk során a DT mohák egy másik energialecsengető mechanizmust is aktiválnak (Heber *et al.* 2001, 2006a, 2007), amely nem igényel protein protonálódást, vagy zeaxantint (Nabe *et al.* 2007), jóllehet a zeaxantinfüggő energia lecsengető mechanizmus aktív marad, és rendelkezésre áll, ha a kiszáradás fényen történik. Ezt nevezzük kiszáradás indukált termális energia disszipációnak és ez a mechanizmus a PSII reakciócentrumaihoz köthető. A kiszáradásindukált NPQ tehát nem igényel fényt, ez teszi lehetővé, hogy a többi energia lecsengetési mechanizmustól megkülönböztessük.

Kiszáradás során, fényen mindkét mechanizmus együttesen segíti a poikilohidrikus kiszáradástűrő mohákat a fotooxidáció káros hatásainak kiküszöbölésében.

2. CÉLKITŰZÉSEK

- A különböző mértékű, 1-hetes időtartamú kiszáradásnak alávetett, *Porella platyphylla* újranedvesedést követő (1h, 24h, 48h), fényen történő fiziológiai regenerációjának vizsgálata sejttani jellemzők, fotoszintetikus (e-transzportlánc működési aktivitás, fotoprotektív mechanizmusok) és egyéb anyagcsere paraméterek monitorozása révén fehérjeszintézis-gátlók, violaxantin-ciklus gátlószer alkalmazása mellett.
- A sejtmag- és a kloroplasztisz-kódolt fehérjék, a violaxantin-ciklus, a fényvédelmi mechanizmusok egyes komponenseinek, kompatibilis ozmolitok rehidráció indukált regenerációs mechanizmusban betöltött jelentőségének vizsgálata.
- Tágabb értelemben olyan növénybiológiai kulcsfolyamatok leírása, amelyek képessé teszik a DT növényeket arra, hogy víztartalmuk extrém mértékű és intenzitású elvesztése után is, regenerálják anyagcsere aktivitásukat.

3. A TÉMAVÁLASZTÁS INDOKLÁSA

A növények kiszáradástűrésének, újranedvesedést követő rendkívül gyors regenerációjának kutatása a növénybiológia frontvonalába tartozó terület, eredményei haszon/kultúr- és természetes környezetünket alkotó növényeink, arid régiókban jelentős ökológiai szereppel bíró kriptobiotikus kérgek fiziológiai folyamatainak pontosabb megértéséhez, a növények kezeléséhez, termesztéséhez, esetlegesen optimálisabb termésmennyiség, gazdasági paraméter eléréséhez elengedhetetlenül fontosak. A vegetatív DT az edényes növényvilágban ritka, a poikilohidrikus növények körében a moháknál általános. A DT mohák ideális modellnövények a kiszáradástűrés fiziológiai mechanizmusainak tanulmányozására, hiszen bennük, mint ősi szárazföldi növényekben a kiszáradástűrés ősi módon jelen van, másrészt vízhiányra adott sejtválaszaik (azonos skálán tekintve!) nem különböznek az edényesekétől. Ugyanakkor nincsenek gyökereik, általánosan sztómaik, fejlett kutikulájuk, többrétegű szövetrendszerük, mezofillumuk, amelyek megnehezítenék a kiszáradás-tolerancia bizonyos sejtszintű vonatkozásainak tanulmányozását. A DT mohák rövid (akár 1 h, de átl. 3 h) idő alatt bekövetkező kiszáradást is képesek elviselni, és újranedvesedés után teljesen helyreállítani az anyagcseréjüket. A kiszáradástűrés genetikai potenciálja egyetemesnek tűnik, azaz jelen van a nem-kiszáradástűrőkben is, azonban a genetikai programja nem nyilvánul meg, ugyanakkor fokozatos akklimatizációval érzékeny növényben is kiváltható bizonyos fokon.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. A vizsgált növény

A *Porella platyphylla* leveles májmoha, extrémén kiszáradástűrő faj (**1. fotó**) (Marschall 1998; Marschall & Proctor 1999). Modellnövényünk Felsőtárkány (Bükk-hegység) északi fekvésű, félárnyékos mészkőszikláiról származott (**2. fotó**). Mészkősziklai előfordulása mellett a faj fatörzsön egyaránt megtalálható. CO₂-fixációja 432 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fényintenzitáson telítődik. Gyakori kiszáradási-újranedvesedési ciklusoknak van kitéve. Természetes élőhelyén hosszabb idejű kiszáradást követően fotoszintetikus aktivitását rendszerint 24 órán belül helyreállítja (Marschall & Proctor 1999). A gyűjtött növényeket alapos válogatás, taxonómiai beazonosítás után, a vizsgálatokig, rövid ideig (3-4 nap) hűtőszekrényben ($\sim 5^{\circ}\text{C}$), teljes turgorállapotban tároltuk műanyag dobozokban, pontosan feljegyezve a gyűjtési körülményeket. A gyűjtések 2013, 2014-ben folyamatosan történtek, ügyelve a minták szezonális azonosságára az azonos kísérleti rendszerekben.



1. fotó: *Porella platyphylla*



2. fotó: A *P. platyphylla* gyűjtési helye

4.2. Alkalmazott mérési módszerek, eljárások

4.2.1. Klorofill-fluoreszcencia indukció a PSII és PSI aktivitás mérésére

A fluoreszcencia intenzitás változásának mérése a kezelt és az újranedvesített növényi mintákon amplitúdó és frekvencia-modulált klorofill fluoreszcencia/P700 mérőrendszerrel (DUAL PAM-100, Heinz Walz Effeltrich, Németország) történt (**3. fotó**). A PSI aktivitására vonatkozó mérési eredményeket ez a dolgozat nem tartalmazza.

Quenching analízis és relaxációs kinetika: A quenching analízist (**1. ábra**) a minták 10 perces sötétadaptációja (20°C -on) előzte meg. A kezdeti fluoreszcencia szint (F_0) gerjesztése egy gyenge ($0,01 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 460 nm-es hullámhosszú modulált fénnel, detektálása pedig egy PIN fotodiódával történt. A maximális fluoreszcencia (F_m) meghatározásához egy ún. telítési intenzitású fényimpulzust (SP, $15000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 0,8-s) alkalmaztunk, ami

pillanatszerűen redukálta a sötét adaptálás által oxidált állapotba hozott összes Q_A -t. A maximális fluoreszcencia F_0 szintre való lecsökkenése után a fotoszintézis gerjesztését 635 nm-es $435 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intenzitású aktív fénnel valósítottuk meg, közben 50 másodpercenként, telítési fényimpulzust alkalmazva az egyensúlyi fluoreszcencia szint eléréséig quenching analízist folytattunk. Az aktív megvilágítás alatt meghatároztuk a megvilágított helyzetben mérhető maximális fluoreszcenciát (F_m') és az F_0' értékét. Az egyensúlyi fluoreszcencia szint elérése után, 1,5 perces sötétadaptációt követően relaxációs kinetika meghatározása következett, melynek során 50 mp-ként telítési fényimpulzusokat alkalmazva az értékeket az F_m' relaxációjáig monitoroztuk.

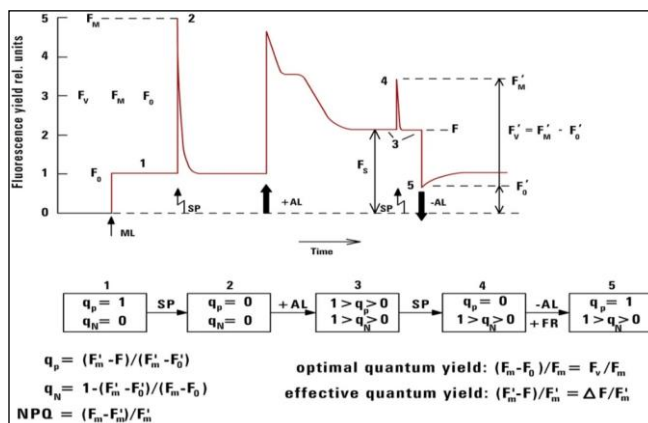
Fénygörbe felvétele: A méréshez a következő fényintenzitási értékeket tartalmazó, előre beállított, és szoftveresen vezérelt fénylépcsőt alkalmaztuk 30 mp-ként: 6, 13, 22, 37, 53, 70, 95, 126, 166, 216, 273, 339, 430, 531, 660, 825, 1028, 1287, 1594 és 1950 μE .

Schreiber *et al.* 1995, Heber *et al.* 2006b, és Schreiber & Bilger 1993 munkái alapján a következő paraméterek mérése és kiszámítása történt:

- F_0 : a sötétadaptált fotoszintetikus rendszerre jellemző kezdeti fluoreszcencia;
- F_0' : a fényadaptált fotoszintetikus rendszerre jellemző kezdeti fluoreszcencia;
- F_m : a sötétadaptált fotoszintetikus rendszerre jellemző maximális fluoreszcencia;
- F_m' : a fényadaptált fotoszintetikus rendszerre jellemző maximális fluoreszcencia;
- F_m'' : a másfél perces sötétadaptáció után a telítési fényintenzitást alkalmazva az F_m' regenerálódási szintje;
- F_s : az adott fényintenzitás hatására kiváltott fluoreszcencia egyensúlyi szintje;
- *PPFD*: fotoszintetikusán aktív radiáció (μE).
- A PS II optimális kvantumhatásfoka: $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$;
- A PS II effektív kvantumhatásfoka: $Y(II) = (F_m - F)/F_m = \Delta F/F_m'$;
- A nem fotokémiai kioltás három különböző módon számolva: $NPQ = (F_m/F_m') - 1$;
 $NPQ = (F_0/F_0') - 1$; $NPQ = (F_m/F_0') - 1$;
- A nem fotokémiai kioltás $NPQ = (F_m/F_m'') - 1$, alkotóira bontva, a lassú komponens:
 $qI = (F_m/F_m'')$ (a másfél perces sötétadaptáció után meghatározott) - 1, illetve a gyors komponens: $qE = NPQ - qI$;
- Fotokémiai kioltás $qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_0')$;
- PSII relatív elektrontranszport rátája: $ETR II = \phi PSII \times PAR \times 0,5 \times 0,84$



3. fotó: Dual-PAM-100,
Porella platyphylla



1. ábra: Quenching analízis elvi vázlat

4.2.2. Porella-kivonat készítése: 0,1 g friss növényi mintát 1 ml 96%-os alkohollal, dörzsmozsárban történő homogenizálás után, centrifugacsőbe öntöttünk, majd 1 ml desztillált vízzel alaposan összeráztuk. A csövek tartalmát 60°C-os vízfürdőn 1h-ig hőkezeltük folyamatos rázatás mellett. Vízfürdő után ismét alapos összerázás, majd 10 perces centrifugálás következett (4000G). A centrifugálást követően a felülúszót eppendorf csövekbe töltve azonnal analíziseknek vetettük alá, vagy -80°C-on tároltuk a különböző mérésekig. Az így készített kivonatot az összoldható szénhidrát-, fruktán-, összfehérjetartalom és az ozmotikus potenciál meghatározásokhoz használtuk.

4.2.3. Membránpermeabilitás vizsgálata: 0,1 g friss növényi mintára 20 ml ultratiszta vizet (MilliQ 50) pipetáztunk centrifugacsövekben. 1 órás, rázógépen történő, kíméletes rázatás után a víz vezetőképességének ($\mu\text{S}/\text{cm}$) meghatározása következett konduktométerrel. Ezután a mintákat -80°C-ra helyeztük 1 napra, majd szobahőmérsékleten kiolvastottuk őket (Szalai 2009). 1 órás, rázógépen történő, kíméletes rázatás után a víz vezetőképességét ismét meghatároztuk. A mérések pontosítása és gyorsítása érdekében ugyanazokat a centrifugacsöveket használtunk a kísérlet teljes időtartama alatt (mérések, fagyasztás, rázatás). Az aktuális ionkiáramlás értékét viszonyítva a 100 %-os ionkiáramlási értékhez kaptuk a membrán aktuális permeabilitásának értékét %-ban.

4.2.4. Prolintartalom meghatározása: A szabad prolin tartalmat Bates és mtsai (1973) nyomán határoztuk meg. 0.04 g friss növényi anyagot (-80°C-on fagyasztott minták) homogenizáltunk 10 ml 3 %-os vizes szulfoszalicilsavban. 2 ml szűrt homogenátumot (Sartorius stedim biotech, Garde: 3hw típusú szűrőparíron) reagáltattunk 2 ml savas ninhidrinnel és ecetsavval 100°C-on 1 óráig → melegítés/forralás közben a kémcsövek tetejét

üveggolyókkal blokkoltuk. A reakciót leállítottuk jeges vízfürdőben → szobahőmérsékletre hűtöttük. A reakcióelegyet 4 ml toluollal extraháltuk és erősen vortexeltük 10-15 s-ig, majd a néhány másodperc után létrejött fázisszeparáció után, a képződött felülúszót/színes fázist lepipetáztunk. Az abszorbanciát 520 nm-en vettük fel, toluolt használva vakként. A minták prolin koncentrációját ($\mu\text{mol g}^{-1}$ száraz tömeg) 3 %-os szulfoszalicilsavban oldott, 5 μM – 500 μM koncentráció tartományú prolin standard görbe segítségével határoztuk meg (Bates és mtsai. 1973, Ringel és mtsai. 2003).

4.2.5. Összfehérjetartalom meghatározása: a Bradford protein assay (1976) alkalmazása során 0,1 g növényi mintát homogenizálása történt 2 ml kivonó oldattal (pH 5 0,1M Na-acetát puffer). A homogenizátum centrifugálása után (10 perc, 4000G) a felülúszó 0,1 ml-jéhez 5 ml Bradford-reagenst adtunk. A reagens hozzáadása után, a megfelelő színreakció kialakulása érdekében, közvetlenül összeráztuk a mintákat, majd 10 perc elteltével 595 nm-en fotometráltuk őket. Az összfehérjetartalmat mg fehérje g^{-1} száraz tömegre vonatkoztatva számoltuk az abszorbancia segítségével, γ -globulin oldatot használva standardként.

4.2.6. Összoldható szénhidrát-tartalom meghatározása: Dubois-assay-t (1956) alkalmazva az előre elkészített Porella-kivonat 25 μl -ét használtuk. 175 μl desztillált víz hozzáadása és összerázás után, 0,2 ml 2%-os fenolt, majd 1 ml cc. H_2SO_4 -et adtunk a reakcióelegyhez. Ismételt összerázás után állni hagytuk 30 percig, azután $\lambda=490$ nm-en (kvarc küvettában) fotometráltuk 2 mM glükózt használva standardként. Az összszenhidrát-tartalmat mmol glükóz g^{-1} száraz tömegre vonatkoztatva adtuk meg.

4.2.7. Fruktántartalom meghatározás: Farrar (1993) módszerét alkalmazva az előre elkészített, és lefagyasztott 100 μl Porella-kivonatot 300 μl desztillált vízzel egészítettük ki. A reakcióelegyhez 0,2 ml 0,45%-os rezorcinolt, majd 1 ml glicerol-réz reagenst adtunk. Az elegyet 12 percig 100°C-os vízfürdőn inkubáltuk. A szobahőmérséklet elérése után a mintákat 470 nm-en fotometráltuk, 1 mM fruktán törzsoldatot használva standardként. A fruktántartalmat mmol fruktóz g^{-1} száraz tömegre vonatkoztatva adtuk meg (Marschall *et al.* 1998).

4.2.8. Ozmotikus potenciál meghatározása: Krioszkópos elven, OSMOMAT 010 ozmométerrel történt, 50 μl Porella-kivonatok 10x-res vagy 20x-ros desztillált vizes hígításával. A $\text{mosmol}^{-1}\text{kg}$ értékeket MPa-ba átszámolva adtuk meg.

4.2.9. Statisztikai analízis

Az eredmények statisztikai analízise SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) szoftverrel, egyutas varianciaanalízist alkalmazva történt. Az egyes kezelések közötti szignifikáns különbségek meglétét vagy hiányát Holm-Sidak teszttel mutattuk ki.

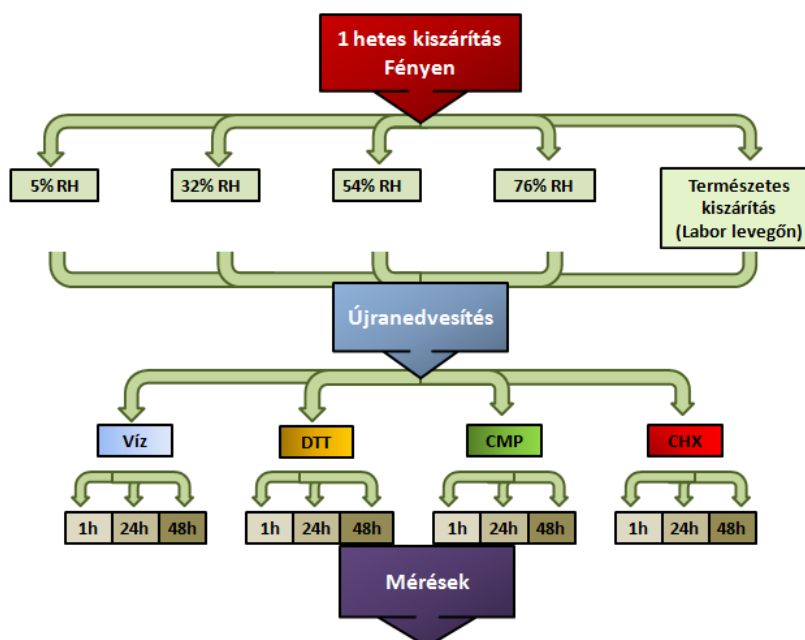
4.2.10. Stressztényezők hatásának monitorozása sejttani, fénymikroszkópos vizsgálatokkal

Kiszáritás-(herbárium példány, hosszú, rövid ideig, intenzíven, kíméletesen kiszáradt növények) –újranedvesítés (idő függvényében), hidegkezelés sötétben (5°C, 5 hónapig), fagyasztás (18, 80°C), hőkezelés (40, 50, 100°C), só (0,5M NaCl, 0,5M CaCl₂, 1M KSCN)-, PEG 8000 (25%)-kezelés, azaz változatos stresszhatások után fénymikroszkópos vizsgálatokkal monitoroztuk a *P. platyphylla* sejttani változásait. Mikroszkópos fotódokumentációt készítettünk. Ezek közül a jelen dolgozat mindössze az 1-hetes kiszáradás hatására bekövetkező sejttani változásokat tartalmazza.

4.2.11. Különböző mértékű 1-hetes kiszáradás után újranedvesedést követő regeneráció stresszfiziológiai vizsgálata, specifikus inhibitorok alkalmazása mellett. Kísérletterv

A mohanövények 1-hetes, természetes (kintről beszűrődő) fényen történő kiszáradásuk során 4-féle eltérő páratartalmú levegővel/közeggel kerültek ekvilibriumba 20°C-on. Az eltérő páratartalmú közegeket különböző sók exikátorokban történő alkalmazásával hoztuk létre, a következők szerint: ~76% RH (NaCl, 20°C-on [Ψ -37,2 MPa]), ~54% RH (CaNO₃·H₂O, 20°C-on [Ψ -82,5 MPa]), ~32% RH (CaCl₂·H₂O, 20°C-on [Ψ -153 MPa]), ~5% RH (54 w/w% H₂SO₄, 20°C-on [Ψ -412 MPa]). Az ún. „természetes kiszáritást”, a laboratóriumi levegőn történő kiszáritás (20°C-on, ~35%-os RH-n, természetes fényen) jelentette. A vizsgálatok megkezdése előtt a teljes turgorállapot megtartása mellett, azonos külső kapilláris víztartalom beállításával, analitikai pontossággal történt a kezelendő minták kimérése. Az ily módon bemért friss tömegekhez minden esetben, párhuzamos minták alkalmazásával, 105°C-on történő, súlyállandóságig történő 3 órás szárítással meghatároztuk a száraz tömeget. A növények relatív víztartalmának (RWC) meghatározása a következők szerint történt: $RWC = (\text{aktuális friss tömeg} - \text{száraz tömeg}) / (\text{teljes turgorállapothoz tartozó friss tömeg} - \text{száraz tömeg})$. A különböző páratartalmú (RH) exikátorokban (kontrollált kiszáritás), illetve a labor levegőn (természetes kiszáritás) 1 hétig vetettük alá kiszáradásnak a növényeket. Az újranedvesítés desztillált vízzel (kontroll vonal), 3 mM CMP-vel (chloramphenicol), 3 mM DTT-vel (dithiothreitol) és 0.3 mM CHX-del (cikloheximid) történt. A CMP-t kloroplasztisz-kódolt fehérjék szintézisének gátlószereként, a CHX-et eukarióta citoplazma fehérjeszintézis gátlószerként, a DTT-t pedig violaxantin-ciklus inhibitoroként (violaxantin-deepoxidáz

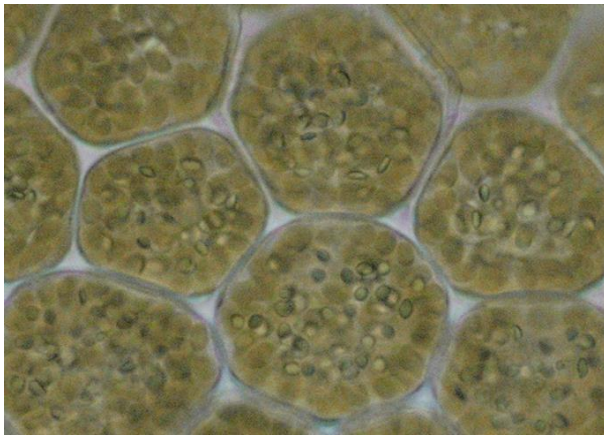
inhibitor, Winter & Königer 1989) alkalmaztuk. Az újrantedvesített mintákat a különböző fiziológiai paraméterek meghatározására 1, 24 és 48 óra eltelte után monitoroztuk és a mérések között 100% RH-jú exikátorban helyeztük el. Az inhibitorok egyes fiziológiai paraméterekre gyakorolt hatásának vizsgálatához nem kizárított, teljes turgorban lévő mintákon is történt inhibitor hatásvizsgálat az idő függvényében.



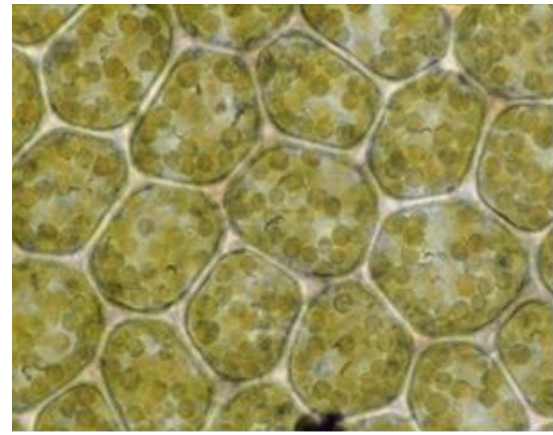
2. ábra: Kísérletterv

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

A fénymikroszkópos vizsgálatok alapján az 1-hetes természetes kiszáradást követő újrantedvesedés után 24 órával a kloroplasztiszok szabálytalanul kör alakúak voltak (**5. fotó**) az elliptikusak helyett (**4. fotó**), melynek hátterében néhány tilakoidális fehérje, a tilakoidális protein komplexek részleges degradációja állhat. Eredményeink összhangban vannak Li és mtsai (2014) eredményeivel, melyek szerint a kiszáradt *Bryum argenteum*-ban a fotoszintézis megszűnt, a klorofilltartalom megmaradt, a kloroplasztiszok szabálytalanul kör alakúak voltak, a kloroplasztisz ultrastruktúrájában az 1-hetes kiszáradás károsodást okozott, és néhány tilakoidális fehérje degradációját eredményezte. Pressel és mtsai (2009) más májmohákon de- és rehidráció alatt elektronmikroszkóppal tanulmányozták a citoszkeleton, az organelláris rendszer változásait, sok újvizsgálendő részterületre mutattak rá. A frissen rehidratálódott DT mohák elektronmikroszkópos felvételein látható kloroplasztisz károsodás foka és a fotoszintézis regenerációjának a mértéke közötti összefüggés további sejttani vizsgálatokat és magyarázatot igényel.



4. fotó: *P. platyphylla* elliptikus kloroplasztiszai nem stresszelt, teljes turgorban lévő növényben (600x-os nagyításon és 2x-es optikai zoommal)

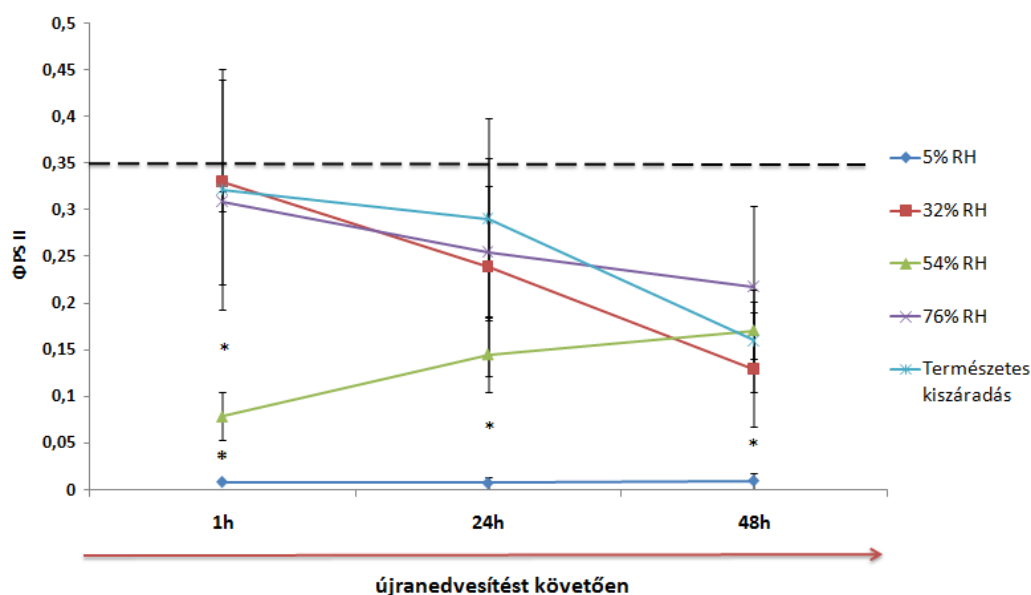


5. fotó: *P. platyphylla* szabálytalanul kör alakú kloroplasztiszai 1-hetes természetes kiszáradást követően, újrantedvesedés után 24 órával (600x-os nagyításon)

A PSII effektív kvantumhatásfoka (Φ PSII) egy stresszmentes, teljes turgorállapotban lévő *Porella platyphylla*-ban általában 0,35-0,40 közötti értékkel jellemezhető, ahogyan ezt a 3. ábrán lévő szaggatott fekete vonal jelzi. A Φ PSII a különböző mértékű 1-hetes kiszáradást követő újrantedvesedés során az első órában 3 különböző értéktartományt (5% RH-n kezelt, az 54% RH-n kezelt, és a 32%, 76% RH-nak, a természetes kiszáradásnak kitett minták) vett fel, melyek között szignifikáns eltérés mutatkozott ($p < 0,05$) (**3. ábra**). Az 5% RH-n történő 1-hetes kezelés olyan drasztikusan (2%-ra) lecsökkentette Φ PSII-t, hogy az 48 óra elteltével sem tudott regenerálódni. Az 54% RH-n történő 1-hetes kiszáradás után az újrantedvesedés első órájában 23%-on volt a Φ PSII, amely 48 óra elteltével regenerációja során elérte az 50%-ot (**3. ábra**).

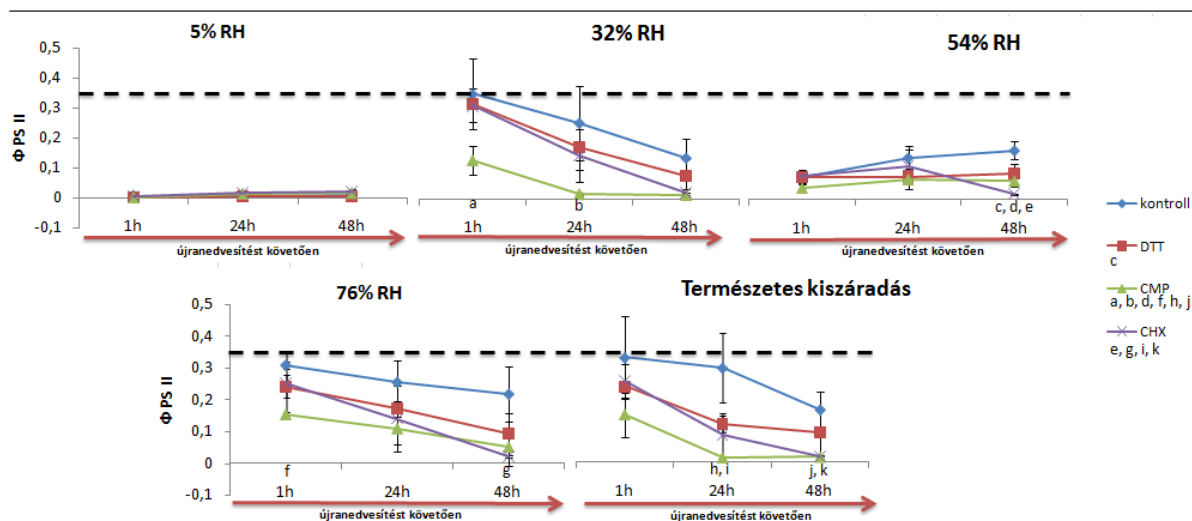
A többi kezelésnél (32%, 76% RH-n, természetes kiszáradított) a Φ PSII közel 90%-os értéket vett fel az újrantedvesedés első órájában, s további emelkedés, regeneráció a kísérlet 48 óras időtartama alatt nem volt detektálható, jelezve, hogy az 1-hetes deszikkációs epizód meghatározó volt. Ugyanakkor ezeknél a mintáknál 24 óra elteltével enyhe csökkenési tendencia mutatkozott a Φ PSII-ben, amely feltehetőleg annak tudható be, hogy a kiszáradástűrő fajt, a természetes körülményeitől eltérően, a rehidráció monitorozása során folyamatosan magas, 100%-os páratartalmú közegben tároltuk. A *P. platyphylla* természetes élőhelyén, 1 nap folyamán akár többször is kiszáradhat (**3. ábra**). A *P. platyphylla*-val összevetve, Li és mtsai (2014) kimutatták, hogy a sivatagi élőhelyről származó *Bryum argenteum* 1-hetes laborlevegőn történő, természetes kiszáradása után, a DT lombosmohafaj az újrantedvesítése után 1 órával már teljesen helyreállította az effektív kvantumhatásfokát.

Effektív kvantumhatások alakulása a különböző mértékű 1-hetes kiszáradást követő újranedvesedés során



3. ábra: A $\Phi PSII$ alakulása *P. platyphylla*-ban a különböző mértékű 1-hetes kiszáradást követő újranedvesedés során. ---- teljes turgorállapotban lévő, stresszmentes növény $\Phi PSII$ értéke. *Az újranedvesítést követően 1h, 24h és 48h elteltével az 5% RH-n kezelt minták értékei szignifikánsan eltértek a természetes, 32%, 54%, 76% RH-n történő kiszáradás értékeitől ($p < 0,05$); az 54% RH-n kezelt minták 1h elteltével szignifikánsan eltértek a természetes, 32%, 54%, 76% RH-n kezelt minták értékeitől ($p < 0,05$). A hibaszávok standard devianciák ($n=3$).

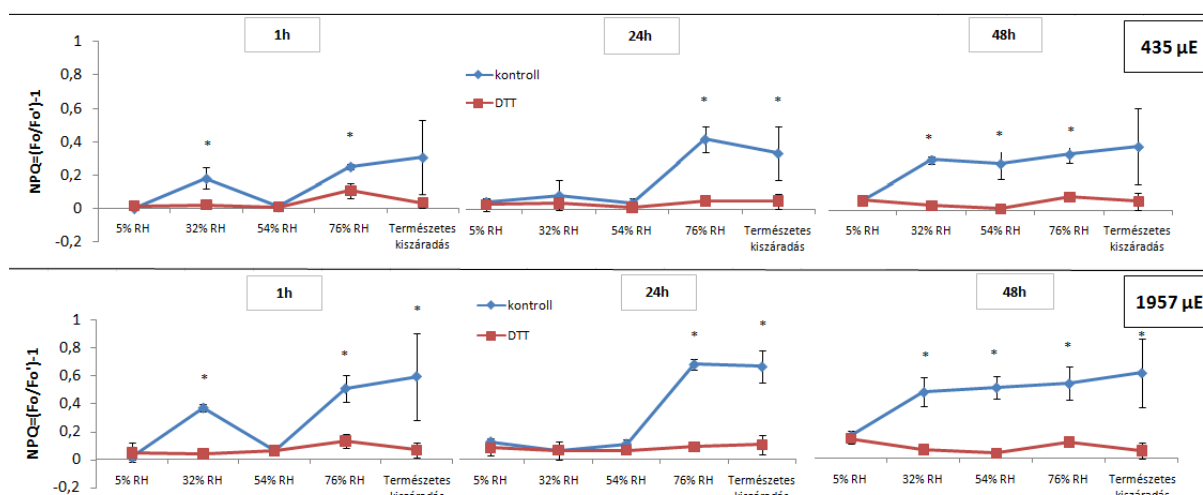
Az effektív kvantumhatások a különböző mértékű, 1-hetes kiszáradást követő újranedvesedés során DTT, CMP, CHX inhibitorok alkalmazása mellett



4. ábra: A $\Phi PSII$ alakulása *P. platyphylla*-ban a különböző mértékű 1-hetes kiszáradást követő újranedvesedés során DTT, CMP, CHX inhibitorok alkalmazása mellett. ---- teljes turgorállapotban lévő, stresszmentes növény $\Phi PSII$ értéke. A kontrollhoz viszonyítva DTT hatására 54% RH-n kezelt minták esetében 48h-val az újranedvesítés után szignifikáns az eltérés (c: $p=0,005$). Szignifikáns különbségek CMP hatására (a kontrollhoz viszonyítva) az újranedvesítést követően: 32% RH-n 1h-val (a: $p=0,005$), 24h-val (b: $p=0,030$); 54% RH-n 1h-val (d: $p<0,001$); 76% RH-n 1h-val (f: $p=0,008$); Természetes kiszáradásnak alávetett minták esetében 24h-val (h: $p=0,001$) és 48h-val (j: $p=0,005$). Szignifikáns különbségek CHX hatására (a kontrollhoz viszonyítva) az újranedvesítést követően: 54% RH-n 48h-val (e: $p=0,001$); 76% RH-n 48h-val (g: $p=0,005$); Természetes kiszáradásnak alávetett minták esetében 24h-val (i: $p=0,007$) és 48h-val (k: $p=0,005$). A hibaszávok standard devianciák ($n=3$).

Az alkalmazott CMP, CHX, DTT inhibitorok hatására az optimális kvantumhatásfok (ábra nem szerepel) újrancedvesítés után 1 órával minimális eltérést mutatott a vízzel történő újrancedvesítéshez képest, mely összhangban van Proctor & Smirnoff (2000) *Racomitrium lanuginosum*-mal kapott eredményeivel. DTT alkalmazása mellett az Fv/Fm értéke 24 h elteltével 81%, 48 h elteltével 60% volt. CMP hatására az Fv/Fm a regeneráció első óráján belül még 80% volt, ugyanakkor 24 óra elteltével 0%-ra csökkent. Az effektív kvantumhatásfok újrancedvesedés alatti alakulásában a CMP szignifikáns csökkenést eredményezett **(4. ábra)**. Az alkalmazott inhibitorok hatását vizsgálva, a Φ PSII újrancedvesedés első óráján belüli (kezdeti) helyreállása azoknál a kezeléseknél, amelyek nem csökkentették le drasztikusan a paramétert, nem függött a kloroplasztisz-kódolt fehérjék szintézisétől **(4. ábra)**. A CMP-nek és a CHX-nek az alkalmazott koncentrációban a fotoszintetikus elektrontranszportlánc működésére nagyon kis hatása volt az újrancedvesedést követő regeneráció első órájában. Ez egybevág az Fv/Fm (itt nem bemutatott) és a Φ PSII gyors kezdeti regenerációjával (1 h-val az újrancedvesedés után) és Proctor és Smirnoff (2000) 3 mohafajra vonatkozó, valamint Csintalan és mtsai (1999) *Grimmia pulvinata*-ra vonatkozó adataival. Az 1 h utáni, további regenerációhoz, vizsgálataink alapján, fontosak a kloroplasztisz-kódolt fehérjék (a csökkent NPQ, és a csökkent Φ PSII háttérében a PSBS és az LHCSR mennyiségének a csökkenése állhat, Gerotto *et al.* 2012), és a citoplazmában folyó fehérjeszintézis, amely szintén lecsökkent a CHX inhibitor hatására. Ez utóbbi érintheti a javító mechanizmus során a rehidrinek expresszáldását, valamint az ozmolitok anyagcseréjét, és az általános szénhidrátanyagcserét. Mely ponton és milyen körülmények között válik a fehérjeszintézis kritikusan fontossá a regeneráció során? Fényen, órákban mérve az időt, a CMP jelentős és folyamatos csökkenést eredményez az optimális kvantumhatásfokban (Li *et al.* 2014), lecsökkentve a fotoszintetikus aktivitást nullára, 1 vagy 2 napon belül még viszonylag alacsony fényintenzitáson is, és ezt a hatást a DTT-kezelés felerősíti. Az újrancedvesedéskori regeneráció alatt a CMP hatása a kloroplasztisz-kódolt (PSII) D1 protein fényen gyors turnover-t jelentősen befolyásolja (Anderson *et al.* 1997). A fehérje destrukció mértéke növekszik, amikor a xantofill-ciklus által meghatározott fényvédelem a DTT-vel gátolt. A CHX-nek kevésbé közvetlen és kevésbé drasztikus a hatása a fotoszintetikus apparátus aktivitására a regeneráció során. A xantofill-ciklus gátlása esetén sem volt teljes a Φ PSII regenerációja **(4. ábra)**.

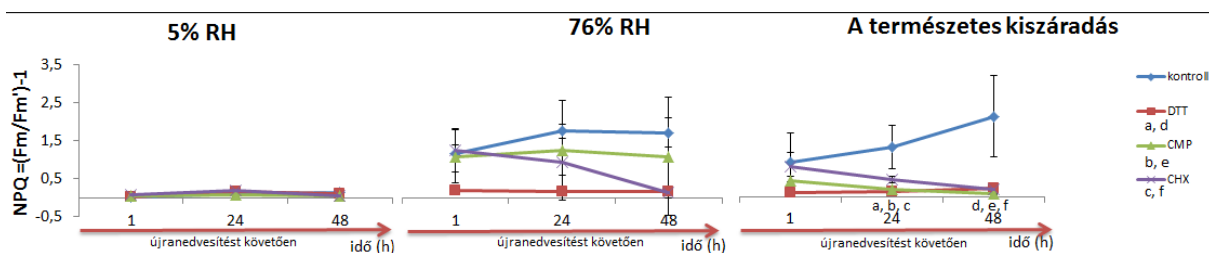
Telítési és magas fényintenzitáson az NPQ alakulása különböző mértékű, 1-hetes kiszáradást követő újranedvesedés során



5. ábra: Az $NPQ=(F_0/F_0')-1$ alakulása a különböző mértékű kiszáradást követő újranedvesedés során 1, 24 és 48 óra elteltével, telítési (435 µE) és magas (1957 µE) fényintenzitáson. 435 µE: A kontrollhoz viszonyítva DTT hatására szignifikáns különbségek az újranedvesítést követő 1 h-val 32% RH-n ($p=0,012$) és a 76% RH-n ($p=0,007$); 24 h-val 76% RH-n ($p=0,001$) és a természetes kiszáritásnak alávetett minták esetében ($p=0,04$); 48 h-val 32% RH-n ($p<0,001$), 54% RH-n ($p=0,007$) és 76% RH-n ($p=0,001$). 1957 µE: A kontrollhoz viszonyítva DTT hatására szignifikáns különbségek az újranedvesítést követő 1 h-val 32% RH-n ($p=0,001$); 76% RH-n ($p=0,004$) és a természetes kiszáritásnak alávetett minták esetében ($p=0,045$); 24 h-val 76% RH-n ($p=0,001$) és a természetes kiszáritás esetében ($p=0,002$); 48 h-val 32% RH-n ($p=0,002$), 54% RH-n ($p=0,001$), 76% RH-n ($p=0,004$) és a természetes kiszáritás esetében ($p=0,026$). * Szignifikancia $p<0,05$. A hibásávok standard devianciák ($n=3$).

Az NPQ-értékek a különböző mértékű kiszáradást követő újranedvesedés során a xantofill-ciklus gátlásával a telítési és a magas fényintenzitáson nem különböztek, jelezve, hogy az NPQ elsősorban a zeaxantintól függött (**5. ábra**). Szignifikáns különbségek ($p<0,05$) a kontroll növényeknél a telítési és a magas fényintenzitáson összehasonlítva a következő kezeléseknél voltak: 1 órával az újranedvesítés után a 32%, 76% RH-n kiszáradt növények esetében; 24 órával az újranedvesítés után, az 54% RH-n kiszáradt növények kivételével, minden kezelést tekintve; 48 órával az újranedvesítés után az 5% és a 54% RH-n kiszáradt növények esetében. A xantofill-ciklus kiiktatásával információt kaptunk a DTT-inszenzitív NPQ-ról, melynek nagysága függött a kiszáradás mértékétől és intenzitásától. 1 h-val az újranedvesítés után szignifikáns különbség a DTT-inszenzitív NPQ értékében pl. a 32% RH-n és a 76% RH-n kiszáradt növényeknél mutatkozott. A kedvezőbb körülmények között kiszáradó minta jobb fényvédelemmel bírt. (24 h elteltével nem volt szignifikáns különbség a DTT-inszenzitív NPQ-k között; 48 h elteltével szignifikáns különbségek a DTT-inszenzitív NPQ-kban: 5%-32%; 5-54%; 54-76%; 54%-Természetes) (**5. ábra**).

Az NPQ alakulása az újranedvesedés során, különböző mértékű 1 hetes kiszáradást követően



6. ábra: Az $NPQ = (F_m/F_m') - 1$ alakulása a különböző mértékű 1-hetes kiszáradást követő újranedvesedés során 1, 24 és 48 óra elteltével, *P. platyphylla*-ban DTT, CMP és CHX inhibitorok alkalmazása mellett. Szignifikáns különbségek: a természetesen kiszáradt minták esetében a kontrollhoz viszonyítva, DTT alkalmazása mellett, az újranedvesítést követően 24 h-val (a: $p=0,001$) és 48 h-val (d: $p=0,003$); CMP alkalmazása mellett az újranedvesítést követően 24 h-val (b: $p=0,001$) és 48 h-val (e: $p=0,002$); CHX alkalmazása mellett az újranedvesítést követően 24 h-val (c: $p=0,006$) és 48 h-val (f: $p=0,003$). A hibasávok standard devianciák ($n=3$).

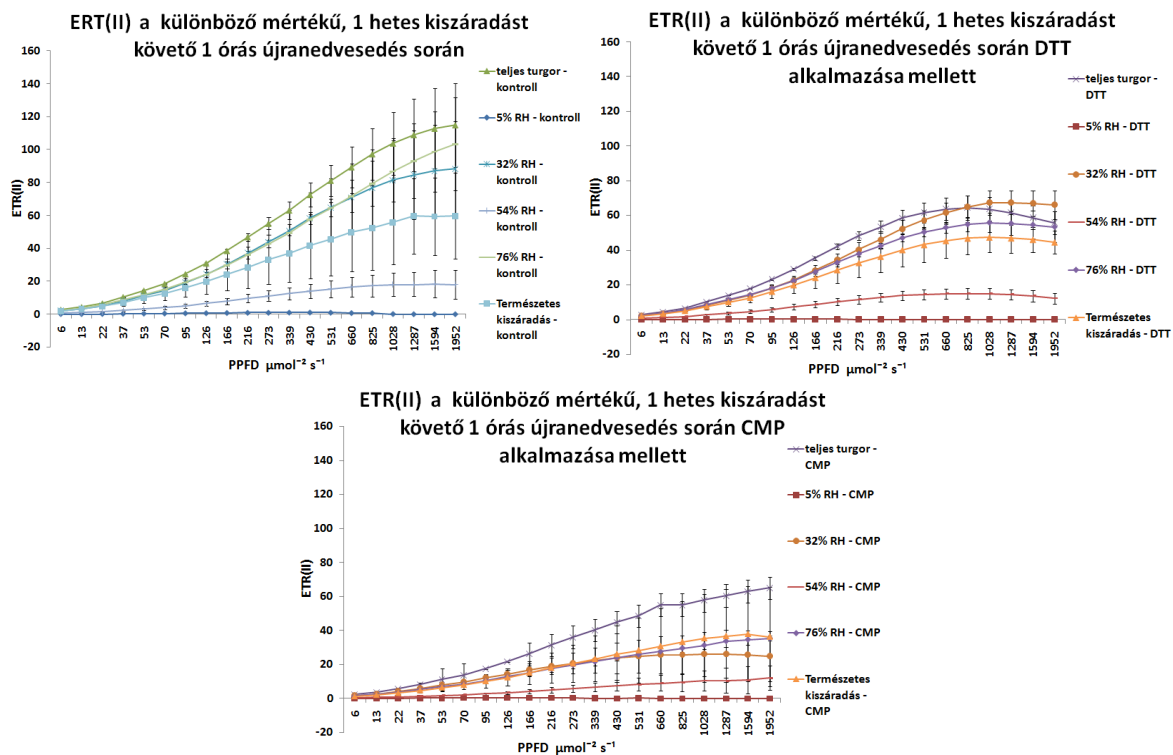
Az 5% RH-n történő kiszáradás drasztikus hatása miatt az NPQ gyakorlatilag 0-ra csökkent (**6. ábra**). Az NPQ komponenseire való bontása (ábra nem szerepel) után is ez látható.

A 76% RH-n történő kiszáradás során (**6. ábra**) az NPQ 24 h alatt regenerálódott, a komponenseit tekintve 1 h regeneráció után 54% qE-46% qI arány, 24 h után 50% qE-50% qI, míg 48 h elteltével 46% qE-54% qI arány volt jellemző. Tehát a qI komponensben enyhe növekedés volt detektálható. A DTT-kezelés hatására a nagyarányú, főleg zeaxantin-függő NPQ-komponens eltűnt, kicsi DTT-inszenzitív NPQ volt kimutatható. A DTT-kezelt minták NPQ értékének komponenseire való bontása után 1h, 24 h, 48 h elteltével az újranedvesedési regeneráció során 68-33-36% qE, valamint 32-67-64% qI arány volt megfigyelhető. A qI növekedése az utóbbiak szerint 32%-os volt. A CMP jelenlétében a 76% RH-n kezelt növények a regeneráció során jelentős az NPQ-val rendelkeztek, amely arra utalhat, hogy a paraméter nagysága nem függött teljes mértékben a regeneráció során a kloroplasztisz-kódolt fehérjeszintézistől, vagy a kíméletes kiszáradásnak köszönhetően a fényvédelmet kiszolgáló mechanizmus nem sérült, felkészült (**6. ábra**). Komponenseit tekintve az idő függvényében (1 h, 24 h, 48 h elteltével az újranedvesedés során) a qE: 51-41-31%, a qI: 49-59-69%. Citoplazma fehérjeszintézis gátlószer mellett a 48 h után drasztikusan lecsökkent az NPQ, komponenseit tekintve: a qE: 51-45-8% és qI: 49-55-92%. A 48 óra elteltével drasztikusan lecsökkent NPQ 92%-át tette ki a qI komponens.

Természetes kiszáradás után (**6. ábra**) az NPQ 24 h alatt regenerálódott, ugyanakkor kevésbé kíméletes kiszáradást jelentett, mint a 76%-os RH-n történő kiszáradás. Ez utóbbi abban is megnyilvánult, hogy a kiszáradásra való felkészülés nem volt olyan hatékony, hiszen a kloroplasztisz-fehérjeszintézis gátlása esetén pl. a 76% RH-n kezelt mintákéhoz képest 55%-kal csökkent 24 h elteltével az NPQ értéke. Az NPQ legnagyobb hányada ennél a kezelésnél

is DTT-függő volt, CMP és CHX hatására jelentősen lecsökkent. Az NPQ-t komponenseire bontva (ábra nem szerepel), azok a következőképpen alakultak az újranedvesedési regenerációs idő függvényében (1 h, 24 h, 48 h elteltével) a természetes kiszáradásnak alávetett minták esetén: Kontroll minták: qE (43-39-36%), qI: 57%-61%-64%; DTT-vel kezelték: qE (30-25-17%), qI: 70-75-83%; CMP hatására: qE: (40-6-0%), qI: 60-94-100%; CHX hatására: qE: 50-27-18%, qI: 50-73-82%. A qI aránya a természetes kiszáradás esetén a legjelentősebben a CMP kezelés hatására nőtt (40%-kal).

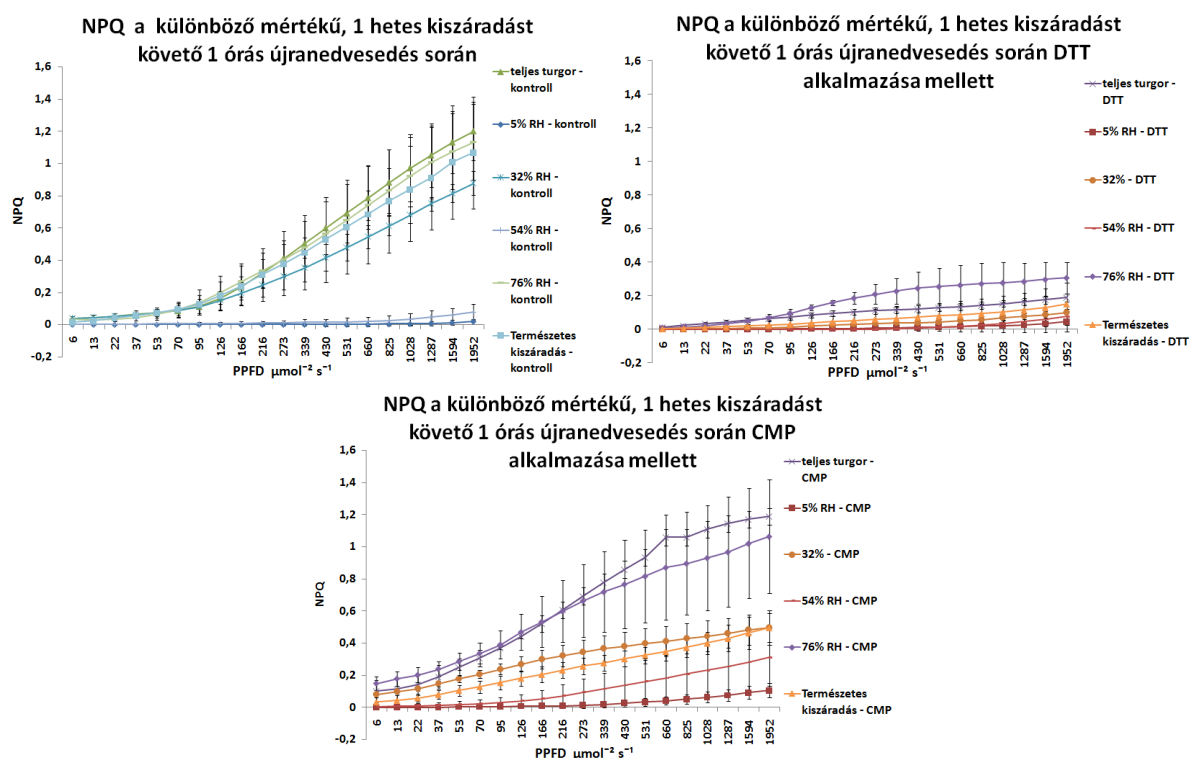
A *Physcomitrella patens* (Gerotto *et al.* 2012) képes az NPQ szintet modulálni a PSBS és/vagy az LHCSR fehérjék koncentrációjának a regulálásával, szükség esetén mennyiségük növelésével, NPQ-szintemelkedést előidézni. Ugyanakkor, amely növényben a PSBS és az LHCSR mennyisége lecsökkent, nemcsak hogy csökkent NPQ-val rendelkezett, de az effektív kvantumhatásfoka is lecsökkent. A *P. platyphyllá*-ban a rehidráció során alkalmazott sejtmag- és kloroplasztiszkódolt fehérjeszintézis inhibitorok a teljes regeneráció során gátolták a citoplazma illetve a kloroplasztisz fehérjeszintézist, feltehetőleg lecsökkentve a PSBS és az LHCSR fehérjék mennyiségét, és ennek eredményeképpen az NPQ-t is. Ahol működött az NPQ, abban az esetben az újranedvesedést megelőző kiszáradási epizód kedvezőbb konstitutív felkészülést tett lehetővé a megfelelő fehérjék, mRNS-komplexek preszintézisével.



7. ábra: Az ETR(II) alakulása a fényintenzitás függvényében a különböző mértékű, 1-hetes kiszáradást követő újranedvesedés során 1 óra elteltével, *P. platyphyllá*-ban DTT és CMP inhibitorok alkalmazása mellett. A hibásávok standard devianciák ($n=3$).

A PSII elektrontranszport rátája (ETR(II)) teljes turgorban, stresszmentes állapotban (kiszáritás nem előzte meg) közel $2000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD-n telítődött. Ehhez közeli válaszreakciót mutatott a 76% RH-n, a laborlevegőn kiszáritott, és kevésbé értelmezhetően a 32% RH-n kiszáradt minta. Ezekről szignifikánsan eltért az 54% RH-n és az 5% RH-n kiszáradt minták elektrontranszport rátája. Gyakorlatilag $216 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD-n telítésbe ment az 54% RH-n kiszáradt mintáké, az 5% RH-n kiszáradtak elektrontranszportja pedig nem működött **(7. ábra)**. Az említett ETR(II) értékekhez tartozó NPQ értékek is ezt tükrözték **(8. ábra)**. A teljes turgorban lévő, stresszmentes növényekben, a 76% RH-n (és a 32% RH-n) kiszáradt mintáknál is), és a természetesen kiszáradt mintáknál a legmagasabbak voltak az NPQ értékek és ezeknek a mintáknak volt a legmagasabb az elektrontranszport rátája (az NPQ értékek még nem mentek telítésbe). Az 5% RH-n és az 54% RH-n kiszáradt mintáknál gyakorlatilag nem működött az NPQ közvetítette fényvédelem, jóllehet $1000 \mu\text{E}$ felett némi nem szignifikáns emelkedés volt detektálható az 54% RH-n kiszáradt minták esetében.

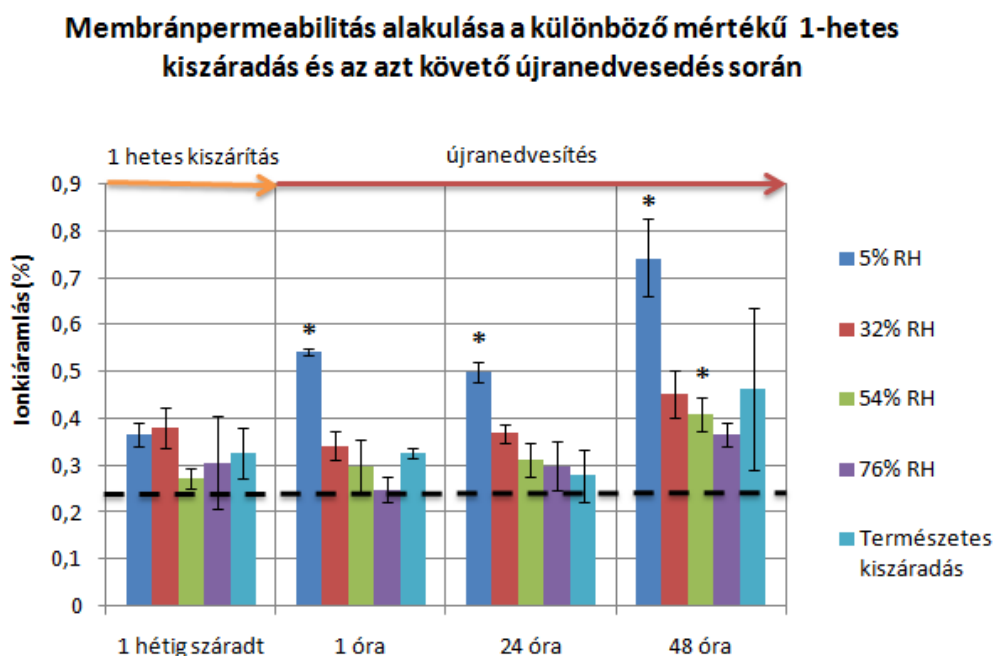
A teljes turgorban lévő, stresszmentes és a 76%-on kiszáradt minták DTT-kezelése után, a xantofill-ciklus blokkolásával az ETR(II) $\sim 40\text{-}50\%$ -kal esett vissza a magasabb fényintenzitásokon **(7. ábra)**; telítési fényintenzitás ($435 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) körüli PPFD-n ment telítésbe, s hasonlóan ugyanazon kezelésekre (76% RH-n, a laborlevegőn kiszáritott, és kevésbé értelmezhetően a 32% RH-n) mintái viselkedtek. A laborlevegőn, az 5% RH-n és az 54% RH-n kiszáradt mintáknál a xantofill-ciklus blokkolása nem okozott további csökkenést a PSII elektrontranszport rátájában, utalva arra, hogy a megmaradt működés már nem xantofill-ciklus függő. Az NPQ-értékek **(8. ábra)** valamennyi kezelésnél jelentősen lecsökkentek, mutatva a xantofill-ciklus jelentőségét, ugyanakkor a megmaradó komponens pedig zeaxantin-független, DTT-inszenzitív. Legjelentősebb a 76%-os RH-n kiszáradt mintákban. Érdekes, hogy a kiszáradási epizódot elszenvedett, 76% RH-n kiszáritott mintáknál jelentősebb volt a fényvédelmi mechanizmus, mint a teljes turgorban lévő mintáknál.



8. ábra: Az NPQ alakulása a fényintenzitás függvényében a különböző mértékű, 1-hetes kiszáradást követő újranedvesedés során 1 óra elteltével, *P. platyphylla*-ban DTT és CMP inhibitorok alkalmazása mellett. A hibásávok standard devianciák ($n=3$).

Az ETR(II) már 1 h alatt is jelentősen lecsökkent a CMP-kezelés hatására (7. ábra). De mivel a teljes turgorban lévő mintánál is (amelyet nem nedvesítettünk újra), ezért nem vonható le az a következtetés, hogy a kloroplasztisz-kódolt fehérjék szintézisének blokkolása befolyásolta az újranedvesedés nyomán a regenerációt, jóllehet az újranedvesedés első órájában lecsökkentette ezt a paramétert. Az ETR(II) alakulásában a kiszáradási epizód meghatározó volt a 76% RH-n, a természetesen kiszáradt és a 32% RH-n kiszáradt mintáknál, amit a nem újranedvesített kontrolltól való szignifikáns eltérés ($p<0.05$) indokol. Azaz ez azt jelenti, hogy az eddigi irodalmi adatoktól eltérően, illetve a *P. platyphylla*-ra vonatkoztatva valamilyen szinten, az újranedvesedés első órájában az elektrontranszportlánc működtetésében szerepet játszik a kloroplasztisz fehérjeszintézise a kíméletesen kiszáradt minták esetében. Viszont az 54% RH-n kiszáradt minták ETR(II) értékének alakulása a CMP-kezelés után már nem függhetett a kloroplasztisz-kódolt fehérjék szintézisétől, mivel a CMP-kezeletlen minták értékét mutatta, és nem csökkentette tovább az inhibitor (7. ábra). A CMP-nek volt egy NPQ növelő hatása, már az alacsonyabb fényintenzitási értékeknél is (8. ábra). Mivel ez a nem újranedvesített kontroll mintánál is megvolt, nem lehet egyértelműen az újranedvesedés-CMP-hatás összefüggésben értékelni. Az 5% RH-n kiszáradt mintáknál a magasabb fényintenzitásoknál jelentkezett az enyhe emelkedés. A laborlevegőn és a 32% RH-n

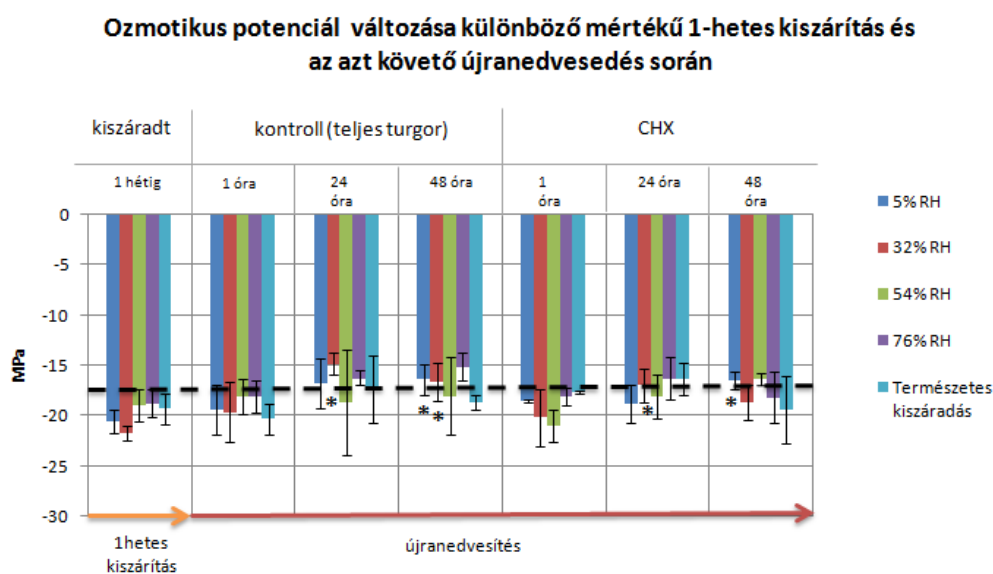
kiszáradt növények vonatkozásában viszont jelentős csökkenés volt tapasztalható, amiből arra következtethetünk, hogy a kevésbé kíméletesen kiszáradt mintákban az újranedvesedés első órájában az újabban szintetizálódó kloroplasztisz fehérjéknek szerepe lehet a fényvédelem kialakításában.



9. ábra: *P. platyphylla* membránpermeabilitásának alakulása a különböző mértékű, 1-hetes kiszáradás és az azt követő újranedvesedés során 1, 24 és 48 h elteltével. ---- teljes turgorállapotban lévő, stresszmentes növény ionkiáramlás % értéke. Szignifikáns különbségeket tapasztalhatunk az 5% RH-n tartott minták esetében az újranedvesedést követően 1h-val ($p=0,001$), 24h-val ($p=0,0029$) és 48h-val ($p=0,002$); 54% RH esetében 48h-val ($p=0,005$). A hibasávok standard devianciák ($n=3$).

A stresszmentes kontrollhoz (----) képest a 76% RH-n kiszáradt növényeket kivéve, az 1-hetes kiszáradás a kezeléseknél általánosan membránpermeabilitás növekedéséhez vezetett, amit az ionkiáramlás értékek jól mutattak (**9. ábra**). A 76% RH-n kiszáradt minták membránjai feltehetőleg nem szenvedtek jelentős károsodást, gyakorlatilag 1h elteltével regenerálódtak. (Fontos megjegyezni, hogy 48 óráig teljes turgorban tartva a rendszeres kiszáradási epizódhoz adaptálódott kiszáradástűrő fajt, ennél a paraméternél is nem várt hatást, a már regenerálódott paraméterű mintáknál is némi stresszhatást, leromlást eredményezett.) Szignifikáns különbségeket ($p<0,05$) az 5% RH-n tartott minták esetében az újranedvesedést követően 1h-val, 24h-val és 48h-val, az 54% RH-n kiszáradt minták esetében 48 h-val az újranedvesedést követően mutattunk ki. Az 5% RH-n és az 54% RH-n kiszáradt minták 48 h elteltével sem tudták ezt a paraméterüket regenerálni. A többi kezelés esetén a növények 48 h elteltével közeljártak a regeneráció eléréséhez (**9. ábra**). Az általunk kapott eredmények összhangban vannak a *Tortula ruralis*-ra vonatkozó szakirodalmi adatokkal (Le & McQueen-Mason 2006;

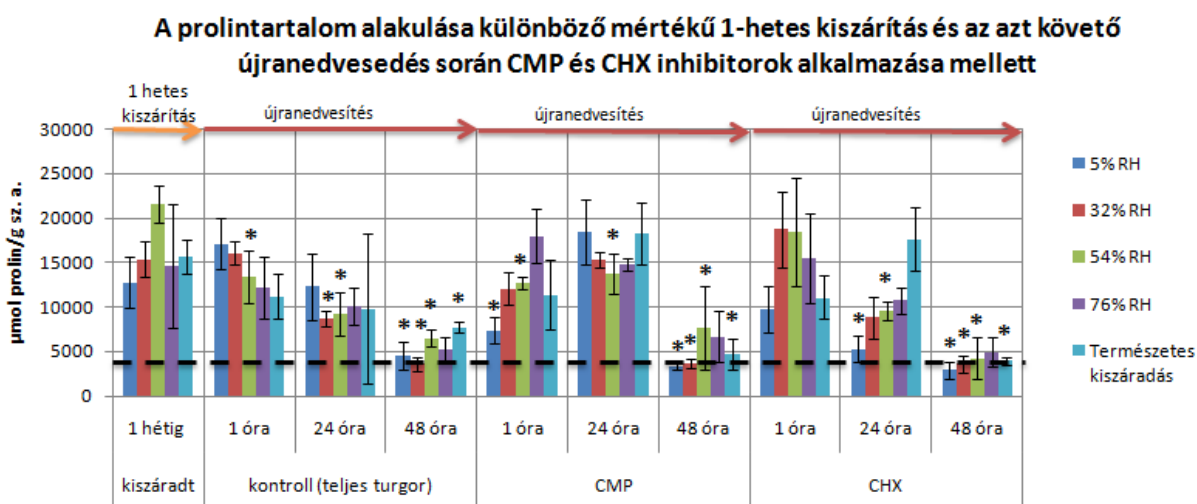
Platt *et al.* 1994), mely szerint a plazmamembrán és az organelum membránok intaktak maradnak és megtartják a normális kettős lipidréteg szerveződésüket a kiszáradt állapotban. A sejtkárosodások kiterjedése a vízvesztés mértékétől és kiterjedésétől, a kiszáradt állapot hosszától függenek. A különböző mértékű kiszáradásnak alávetett mintákra kapott eredményeink értelmezésénél figyelembe vettük és mi is igazoltuk Deltoro és mtsai (1998b) megállapításait, mely szerint bizonyítottan van elektrolitkieresztés közvetlenül az újranedvesedést követően, ugyanakkor a normál membránintegritás a kiszáradástűrő fajokban, ahogyan a *P. platyphylla* esetében is, gyorsan helyreáll.



10. ábra: Ozmotikus potenciál alakulása *P. platyphylla*-ban, a különböző mértékű, 1-hetes kiszáradás és az azt követő újranedvesedés során 1, 24 és 48 h elteltével, CHX inhibitor alkalmazása mellett. ---- teljes turgorállapotban lévő, stresszmentes növény, szukcesszív eljárással készített kivonatának oszmotikus potenciál értéke. * A kiszáradt mintákhoz hasonlóan a teljes turgor állapotban lévő növényi minták között szignifikáns különbségek az 5% RH-n az újranedvesítést követő 48h-val ($p=0,005$); 32% RH-n az újranedvesítést követő 24h-val ($p=0,001$) és 48h-val ($p=0,007$). A kiszáradt mintákhoz hasonlóan CHX inhibitor alkalmazása mellett szignifikáns különbségek az 5% RH-n újranedvesítést követő 48h-val ($p=0,006$); 32% RH-n az újranedvesedést követő 24h-val ($p=0,003$). A hibásávok standard devianciák ($n=3$).

A 10. ábrán feltüntetett oszmotikus potenciál értékek nem az aktuális sejtnedv potenciál értékeket mutatják, hanem a szukcesszív eljárással készített kivonatokra vonatkozó oszmotikus potenciál értékeket, amelyek a 96%-os etanollal kioldható és az (ahhoz tartozó üledék) azt követő 60°C-os forró vizes extrakcióval nyert, és végül egyesített minták értékei. Ez indokolja azt extrém magasnak tűnő értékeket. A cél az összoldható és a szukcesszív extrakcióval kioldható szénhidrátkomponensek által együttesen kialakított oszmotikus potenciál részesedés feltárása volt. A szakirodalmi adatoknak megfelelően lombosmohákban (Santarius 1994) a szénhidrátok oszmotikus potenciál részesedése 1/3. A 10. ábrán bemutatott oszmotikus potenciál értékek, minthogy nem az aktuális sejtnedv potenciál értékeket mutatják, hanem az

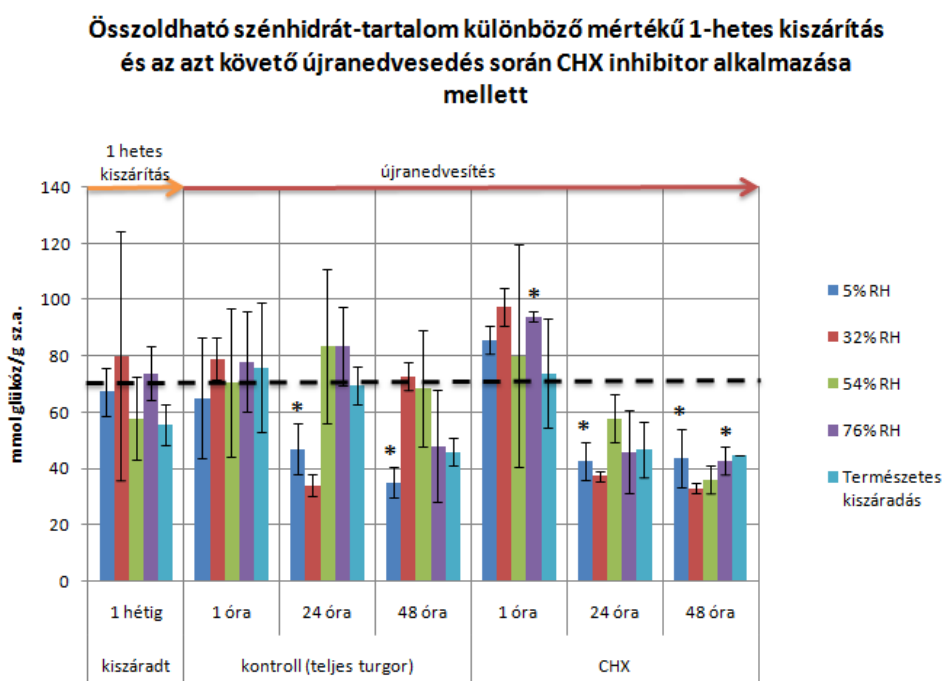
összes alacsony és magas molekulású, szukcesszív eljárással oldható szénhidrát komponens általt kialakított értéket, nagyságrendileg nem vethetők össze a rendelkezésre álló, és egyébként is kevés, szakirodalmi értékekkel. A legnegatívabb ozmotikus potenciál értékek a legdrasztikusabb kiszáradásnak (5%, 32% RH-n) alávetett növényekre voltak jellemzőek, jól tükrözve az őket körülvevő rendkívül alacsony vízpotenciálú külső közeg jelenlétét. Az 5%-on és a 32%-on kiszáradt növények 48 h elteltével regenerálták a stresszmentes állapotra jellemző értéket (----). A többi kezelésnél nem volt szignifikáns változás a kiszáradást követő újranedvesedés során, de általános trendként jellemző az értékek csökkenése az újranedvesítés után. A citoplazma fehérjeszintézis inhibitor hatása az újranedvesedés után jóllehet nem okozott szignifikáns különbséget a kontrollokhöz képest, ugyanakkor az átlagértékek csökkenése, közelítve a stresszmentes kontroll szintjét, kevésbé volt trendszerű (10. ábra).



11. ábra: A prolintartalom alakulása *P. platyphylla*-ban, a különböző mértékű, 1-hetes kiszáradás és az azt követő újranedvesedés során 1, 24 és 48 h elteltével, CMP és CHX inhibitorok alkalmazása mellett. ---- teljes turgorállapotban lévő, stresszmentes növény szabad prolintartalma $\mu\text{mol g}^{-1}$ sz.a.-ban. * Szignifikanciát az 1-hetes kiszáradt minták értékei és a soronkövetkező újranedvesített állapotaikhoz tartozó prolintartalmak között kerestünk. * Szignifikáns különbségek a kontroll (inhibitor nélküli) növényeknél az újranedvesítést követő 1h-val 54% RH-n ($p=0,016$), 24h-val 32% RH-n ($p=0,006$) és 54% RH-n ($p=0,003$), 48h-val 5% RH-n ($p=0,012$), 32% RH-n ($p=0,001$), 54% RH-n ($p=0,001$) és a természetes kiszáradásnak alávetett minták esetében ($p=0,003$). CMP alkalmazása mellett az újranedvesítést követő 1h-val szignifikáns különbségek mutatkoztak az 5% RH-n ($p=0,043$) és 54% RH-n ($p=0,002$), 24h-val 54% RH-n ($p=0,012$), 48h-val 5% RH-n ($p=0,005$), 32% RH-n ($p=0,001$), 54% RH-n ($p=0,009$) és a természetes kiszáradásnak alávetett minták esetében ($p=0,002$). CHX alkalmazása mellett az újranedvesítést követő 24h-val szignifikáns különbségek jelentkeztek 5% RH-n ($p=0,016$) és 54% RH-n ($p=0,001$), 48h-val 5% RH-n ($p=0,005$), 32% RH-n ($p=0,001$), 54% RH-n ($p=0,001$) és a természetes kiszáradásnak alávetett minták esetében ($p=0,001$). A hibasávok standard devianciák ($n=3$).

A prolintartalom jelentősen és a teljes turgorállapotban lévő, stresszmentes növény szabad prolintartalmához képest (----) szignifikánsan ($p<0.05$) megemelkedett a különböző körülmények között 1 hétig száradt növényekben (11. ábra). A *P. platyphylla* kiszáradás alatt jelentkező prolinakkumulációját ez a dolgozat mutatja be először. Ebben a leveles

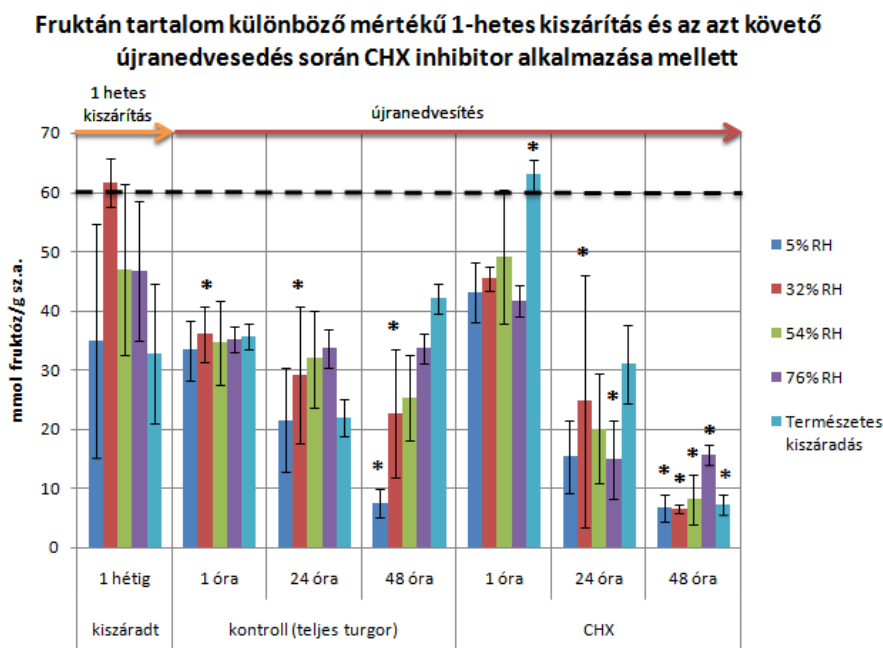
májmoszában a prolin, a szacharóz és a fruktánok, mint kompatibilis ozmolitok felhalmozásának elsődleges célja az ozmoreguláció (Marschall *et al.* 1998; Tari *et al.* 2003), de emellett résztvesznek a makromolekulák (elsősorban fehérjék), a membránok, a sejt struktúrájának kiszáradás alatti stabilizálásában. A különböző mértékű kiszáradás hatása nem tükröződött a kiszáradt minták prolintartalmában, ilyen szempontból nem volt közöttük szignifikáns különbség. Szignifikanciát az 1-hetes kiszáradt minták értékei és a soronkövetkező újranevesztett állapotaikhoz tartozó prolintartalmak között kerestünk és a **11. ábra** magyarázó szövegében tüntettük fel. 48 h elteltével a stresszmentes prolinszintre álltak vissza az értékek valamennyi kezelés esetében. A kloroplasztisz-kódolt fehérjék szintézisét gátolva, 24 órával az újranevesztés után még viszonylag magas prolinszint volt detektálható.



12. ábra: Az összes oldható szénhidrát-tartalom alakulása *P. platyphylla*-ban, a különböző mértékű, 1-hetes kiszáradás és az azt követő újranevesztés során 1, 24 és 48 h elteltével, CHX inhibitor alkalmazása mellett. ---- teljes turgorállapotban lévő, stresszmentes növény glükózra vonatkoztatott, szukcesszív eljárással készített kivonatának összes oldható szénhidráttartalma mmol g⁻¹ sz.a.-ban. * Szignifikanciát az 1-hetes kiszáradt minták értékei és a soronkövetkező újranevesztett állapotaikhoz tartozó értékek között kerestünk. Szignifikáns különbségek a kontroll (inhibitor nélküli) 5% RH-n az újranevesztést követő 24h-val (p=0,023) és 48h-val (p=0,003), illetve CHX inhibitor alkalmazása mellett 5% RH-n az újranevesztést követő 24h-val (p=0,010) és 48h-val (p=0,014), illetve 76% RH-n az újranevesztést követő 1h-val (p=0,023) és 48h-val (p=0,008). A hibásávok standard devianciák (n=3).

Az összoldható szénhidráttartalom, (melyhez az extraktumok az ozmotikus potenciál mérésénél használt extraktumokkal közösek voltak) a stresszmentes, teljes turgorban lévő növények értékeihez képest a különböző mértékű 1-hetes kiszáratás után, és 1 órával az

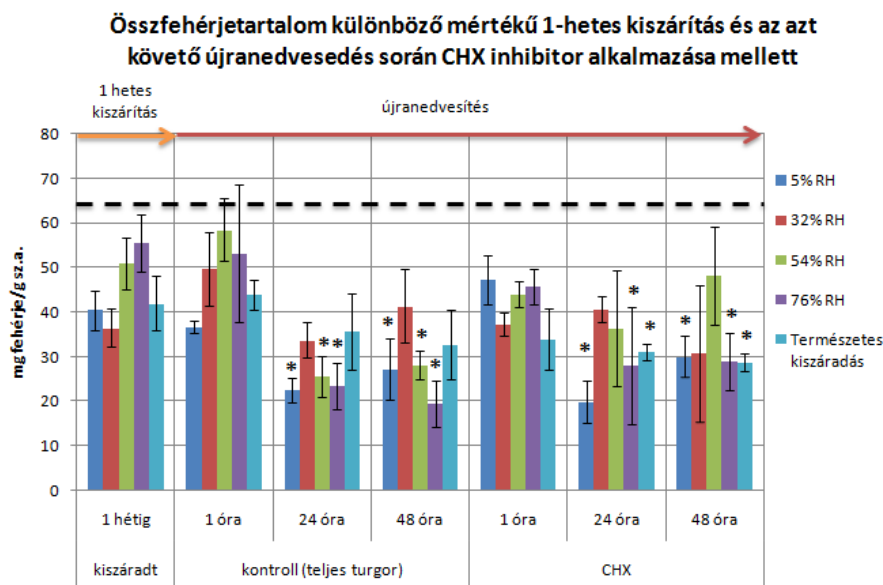
újrandedvesítés után sem mutatott szignifikáns különbséget, utalva egy jól kiegyensúlyozott szénhidrát pool jelenlétére. A drasztikusabb kiszáritásnak (5% RH-n) kitett minták szénhidráttartalma a vízzel történő újrandedvesítés után 48 h-val sem tudott regenerálódni, míg a többieké igen. A citoplazma fehérjeszintézis inhibitor oldatával újrandedvesített növények 48 h-s regenerációjuk során sem tudták szénhidráttartalmukat a stresszmentes szintre visszaállítani, jóllehet a regeneráció első órájában viszonylag magas értékkel rendelkeztek (12. ábra).



13. ábra: Fruktántartalom alakulása *P. platyphylla*-ban, a különböző mértékű, 1-hetes kiszáradás és az azt követő újrandedvesedés során 1, 24 és 48 h elteltével, CHX inhibitor alkalmazása mellett. ---- teljes turgorállapotban lévő, stresszmentes növény fruktózra vonatkoztatott, szukcesszív eljárással készített kivonatának fruktántartalma mmol g⁻¹ sz.a.-ban. * Szignifikanciát az 1-hetes kiszáradt minták értékei és a soronkövetkező újrandedvesített állapotaikhoz tartozó értékek között kerestünk. * Szignifikáns különbségek mutatkoztak a kontroll (inhibitor nélküli) 5% RH-n az újrandedvesítést követő 48h-val (p=0,027), 32% RH-n 1h-val (p=0,009), 24h-val (p=0,002) 48h-val (p=0,001). CHX inhibitor alkalmazása mellett az újrandedvesítést követő 1h-val a természetes körülmények között kiszáradt minták (p<0,001), 24h-val a 32% RH-n (p<0,001) és a 76% RH-n (p=0,001). 48h-val a CHX inhibitorral történő újrandedvesítést követően minden RH-n kiszáradt minta szignifikánsan eltért a neki megfelelő kiszáradt minta értékeitől (p<0,05). A hibasávok standard devianciák (n=3).

Az 1-hetes kiszáritás nem okozott drasztikus változást a fruktántartalomban (alacsony és nagy molekulású fruktánok együttesen meghatározva a szukcesszív kivonatkészítés során) (13. ábra). A fruktántartalom - a stresszmentes kontrollhoz képest (----) - alacsonyabb értékeket mutatott a regeneráció során az eltérően kiszáradt növényekben, és 48 h alatt sem érte el a stresszmentes növényekben mért értéket. Ugyanakkor a kiszáradt és az újrandedvesített mintákban csak az 5% RH-n kiszáritott növények esetében volt szignifikáns a különbség (p<0.05), noha a citoplazma fehérjeszintézis inhibitor alkalmazása mellett, 48 h-val az újrandedvesítés után jelentősen, nemcsak az 5% RH-n kiszáritott növényekben, hanem

valamennyi kezelés esetében szignifikánsan lecsökkent a fruktánok mennyisége. A citoplazma fehérjeszintézisnek feltehetőleg van szerepe a fruktántartalom újranedvesedés alatti változásában. (A változás polimerizációs fok-változást is jelenthet.) A *Porella platyphylla*-ban a szacharóz és a fruktán a fő oldható szénhidrát. A fruktánok növekvő polimerizációs fokkal homológ sort alkotnak a zárwatermőkéhez hasonlóan, és inulin típusúak (Marschall *et al.* 1998). Az oldható szénhidrátkészlet kiegyensúlyozott, a szénhidrátkezelések, sötétéheztetés, kiszáradás és alacsony hőmérséklet kis mértékben befolyásolják, a fruktánok megőrződnek a tekintélyes szacharózkészlet terhére. A vízőldékony fruktánokkal rendelkező faj képes rövid idő alatt és könnyen mobilizálni szénhidráttraktárait, a fruktánok polimerizációs fokának gyors változtatásával reagálni a környezeti tényezők kedvezőtlen alakulására. A DT mohák stratégiájának lényeges konstitutív vonása az, hogy az ozmotikusan aktív szénhidrátok közül a szacharóz mennyisége jelentős, azok szintje gyakorlatilag nem változik a kiszáradás és az újranedvesedés során. A fruktántartalom a szezonálisan száraz és/vagy hideg környezetben evolúciós előnyt jelenthet az adott fajnak (Marschall 2010).



14. ábra: Az összfehérjeter tartalom alakulása *P. platyphylla*-ban, a különböző mértékű, 1-hetes kiszáradás és az azt követő újranedvesedés során 1, 24 és 48 h elteltével, CHX inhibitor alkalmazása mellett. ---- teljes turgorállapotban lévő, stresszmentes növény összfehérjeter tartalma mg g^{-1} sz.a.-ban. * Szignifikanciát az 1-hetes kiszáradt minták értékei és a soronkövetkező újranedvesített állapotaikhoz tartozó értékek között kerestünk. * Szignifikáns különbségek mutatkoztak a kontroll (inhibitor nélküli) minták 5% RH-n az újranedvesítést követő 24h-val ($p=0.012$) 48h-val (0.05), 54% RH-n 24h-val ($p=0.012$) és 48h-val ($p=0.009$) és 76% RH-n 24h-val ($p=0.005$) és 48h-val ($p<0.001$). CHX inhibitor hatására 5% RH-n az újranedvesítést követő 24h-val ($p<0.001$), 48h-val ($p=0.047$) 76% RH-n 24h-val ($p=0.009$) 48h-val ($p=0.002$) és a természetes körülmények között kiszáradt minták között 24h-val ($p=0.042$) és 48h-val ($p=0.023$). A hibásávok standard devianciák ($n=3$).

Az összfehérjeter tartalom a stresszmentes növények értékeihez (----) képest a kiszáradt és az újranedvesített mintákban általában alacsonyabb volt (**14. ábra**). 24, és 48 óra elteltével az 5% RH-n, 54% RH-n és a 76% RH-n kiszáradt minták esetében a kiszáradt minták értékéhez képest is szignifikáns ($p<0.05$) csökkenést mutatott. Az inhibitor jelenléte az

összfehérjetartalom értékének alakulásában a regeneráció során nem okozott változást. Ez nem azt jelenti, hogy a fehérjeszintézis nem fontos a regenerálódás során, hanem az összfehérjetartalom alakulásában mennyiségileg nincs kimutatható változás nettó, viszont feltehetőleg egyes fehérjék szintjének, mennyiségének alakulásában csak pl. molekuláris biológiai módszerekkel lenne detektálható a változás. A rehidrációt követően expresszáldó rehidrinek, ahogyan a *Tortula ruralis*-ban ez már leírt (Oliver *et al.* 2010), feltehetőleg szerepet töltenek be a folyamatban. A megfelelő proteinek azonosítása *P. platyphylla* esetében is nagyon fontos lenne.

Az extrémén kiszáradás-toleráns mohafajok regenerációja a konstitutív tolerancia és egy újrandedvesedés alatti és az azt követő javító mechanizmus kombinációjától függ. A fotoszintézis kezdeti (1 órán belüli) újraéledése rendkívüli módon gyors bennük, és független, míg a teljes regeneráció általában nagyban függ a fehérjeszintézistől, a tilakoid protein komplexek újrászerveződése okán. A rövid idejű, vagy mérsékelt dehidrációt követve a fotoszintézis teljes újraéledése csak korlátozott mértékben igényel kloroplasztisz-kódolt fehérjeszintézist. A legnagyobb igényt a fehérjeszintézisre a DT mohák regenerációja során a fotooxidatív károsodás idézi elő/indokolja, különösen a PSII D1 proteinjéé. Az újrandedvesedést követően zajló fehérjeszintézist meghatározó elemek a *P. platyphylla*-ban a tilakoid proteinkomplexek reorganizációja, a citoszkeleton és az organelláris fehérjekomponensei, a rehidrinek expresszáldása és szintézise, kompatibilis ozmolitok, összoldható szénhidrátok szintézisének enzimrendszerei, az NPQ mechanizmusait aktiváló (PsBs, LHCSR) fehérjék, a javító és az antioxidáns folyamatokban résztvevő fehérjék. Az NPQ és a xantofill-ciklus által meghatározott fényvédelem különösen fontos a DT mohák számára. A javító mechanizmus változatos és nagyon különböző időbeli lefutású folyamatokat foglal magába, a sejtfalak átítatódásától a makromolekulák rehidratálódásán át (amelyek percek alatt befejeződnek) a rehidrinek expressziójáig, amely néhány órát is igényel. A folyamatok sokféleségének a vizsgálata nagy kihívást jelent a jövőbeli kutatások számára.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A *P. platyphylla* kiszáradástűrése alapvetően konstitutív elemekből áll. Az újrandedvesedéskor aktiválódó regeneráló és javító mechanizmus változatosságát és időbeli lefutását a kiszáradási epizód intenzitása és időtartama jelentősen meghatározza. A regeneráció szempontjából a legoptimálisabb volt a 76%-os páratartalmon történő kiszáradás.

Az 1-hetes természetes kiszáradást követő újrandedvesedés után 24 órával a kloroplasztiszok szabálytalanul kör alakúak voltak az elliptikusak helyett, melynek hátterében néhány

tilakoidális fehérje, a tilakoidális protein komplexek részleges degradációja állhat. Ezen változások klorofill fluoreszcencia paraméterekben való nyomon követése, további vizsgálatok tárgyát képezheti.

Vizsgálataink alapján a tilakoid funkcióhoz kapcsolt fotoszintetikus folyamatok kezdeti (az 1 órán belüli) újraéledése rendkívüli módon gyors volt és a fehérjeszintézistől függetlennek bizonyult (csak kismértékben volt csökkenthető inhibitorokkal), míg a fotoszintézis teljes regenerációja az újrandedvesedés során igényelt fehérjeszintézist (különösen a tilakoid protein komplexekben résztvevő fehérjékét), a tilakoid protein komplexek fényen történő újrászerveződése okán. Ugyanakkor, enyhe mértékű dehidrációt (76%-os RH-n történő kiszáradást) követően a fotoszintézis teljes újraéledése csak korlátozott mértékben függött a kloroplasztisz-kódolt fehérjék szintézisétől.

A Φ PSII 1h-n belüli (kezdeti) helyreállása azoknál a kezeléseknél (pl. 76%-os RH-n történő kiszáradás), amelyek nem csökkentették le drasztikusan a paramétert, nem függött a kloroplasztisz-kódolt fehérjék szintézisétől. A CMP-nek és a CHX-nek a fotoszintetikus e^- -transzportlánc működésére nagyon kis hatása volt a regeneráció első órájában. Az 1 h utáni, további regenerációhoz, vizsgálataink alapján, fontosak a plasztisz-kódolt fehérjék (a csökkent NPQ, és a csökkent Φ PSII háttérében a PSBS és az LHCSR mennyiségének a csökkenése állhat), és a citoplazmában folyó fehérjeszintézis, amely szintén lecsökkent a CHX inhibitor hatására. Ez utóbbi érintheti a javító mechanizmus során a rehidrinek expresszáldását, valamint az ozmolitok anyagcseréjét, és az általános szénhidrátanyagcserét. Jellemző volt az 1-hetes kiszáradást követő membránpermeabilitás-növekedés az újrandedvesedés során, de a drasztikus (5%-os és 54%-os RH-n történő) kiszáradást szenvedett minták kivételével a normál membránfunkció 24 illetve maximum 48 óra elteltével helyreállt. A fehérjeszintézisre a DT mohák regenerációja során a legnagyobb igényt a fotooxidatív károsodást szenvedő fehérjék (elsősorban a PSII D1 proteinjéé) és a javító és az antioxidáns folyamatokban résztvevő fehérjék idézik elő. Az összfehérjetartalom a különböző módokon előidézett kiszáradt állapotokban és az újrandedvesítés alatti regeneráció során vett mintákban általában alacsonyabb volt, mint a stresszmentes, teljes turgorban lévő minták esetében.

A xantofill-ciklus aktivitása nagy jelentőségű a fényen történő regeneráció során; nagyobb arányú zeaxantin-függő és kisebb arányú DTT-inszenzitív NPQ jelenlétét igazoltuk. Ez utóbbinak a nagysága függött a kiszáradás mértékétől és intenzitásától. A kedvezőbb, kevésbé drasztikus körülmények között kiszáradó minta jobb fényvédelemmel bírt.

A legnagyobb (azaz a negatívabb) ozmotikus potenciál értékek az intenzívebb kiszáradásnak (5%, 32%) alávetett növényekre voltak jellemzőek. Az összoldható szénhidrátartalom a

különböző mértékű 1-hetes kiszáritás után, és 1 órával az újranedvesítés után sem mutatott szignifikáns különbséget, utalva egy jól kiegyensúlyozott szénhidrát pool jelenlétére.

A prolintartalom jelentősen megemelkedett, a fruktántartalom alacsonyabb értéket mutatott a különböző mértékű, 1-hetes kiszáradás során. A fruktánok szintje a regeneráció során 48 h alatt sem érte el a stresszmentes növényekben mért értéket. A citoplazma fehérjeszintézisnek feltehetőleg van szerepe a fruktántartalom újranedvesedés alatti változásában.

A faj a fotoszintézis regenerációjának gyorsaságát annak is köszönheti, hogy a kiszáradt és a nedves állapot közötti gyors átmenetnek természetes élőhelyén gyakran ki van téve, szemben azokkal a fajokkal, amelyek sokkal lassabb és kevésbé gyakori változásokat élnek meg, de ugyanakkor képesek túlélni hosszabb kiszáradást.