

**A D1 PROTEIN MUTÁCIÓ HATÁSA A KETTES FOTOKÉMIAI RENDSZER ENERGIA-  
HASZNOSÍTÁSÁRA ELTÉRŐ VÍZELLÁTÁSÚ NÖVÉNYEKBEN**

Ph.D. értekezés

Bajkán Szilvia

Témavezető: Prof. Dr. Lehoczki Endre

Biológia doktori iskola

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar  
Növénybiológiai Tanszék

Szeged  
2011

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>Rövidítések és jelölések jegyzéke</b>	<b>4</b>
<b>1. Bevezetés</b>	<b>6</b>
<b>2. Irodalmi áttekintés</b>	<b>8</b>
2.1. Az elnyelt fényenergia sorsa a fotoszintézis során	8
2.1.1. <i>A fény fotokémiai hasznosulása</i>	8
2.1.2. <i>A többlet elnyelt fényenergia sorsa és káros hatásai a növények leveleiben</i>	11
2.1.3. <i>A fény káros hatásaival szemben kialakult fotoprotektív mechanizmusok</i>	12
2.1.4. <i>A nem-fotokémiai kioltás és lokalizációja magasabbrendű növényekben</i>	13
2.1.5. <i>A xantofillok szerepe a hődisszipáció folyamatában, a xantofill ciklus-függő és független nem-fotokémiai kioltás</i>	17
2.1.6. <i>A PsbS fehérje szerepe a hődisszipáció folyamatában</i>	20
2.2. A vízdeficit hatása a magasabbrendű növények fotoszintézisére	22
2.2.1. <i>A vízhiány fokozatainak jellemzése, a sztomatikus és a nem-sztomatikus limitáció értelmezése</i>	22
2.2.2. <i>A védekező/szabályozó folyamatok szerepe a vízhiány kivédésében</i>	25
2.2.3. <i>Stratégiák a vízhiány tolerálására</i>	27
2.3. Az atrazin rezisztencia	28
<b>3. Célkitűzés</b>	<b>32</b>
<b>4. Anyag és módszer</b>	<b>33</b>
4.1. A vizsgált növényi anyag	33
4.2. Növénynevelés, vízmegvonás	33
4.3. Reciprok keresztezések kivitelezése, genetikai analízis	34
4.4. A növény vízellátásának vizsgálata	35
4.4.1. <i>Sztómasűrűség vizsgálata</i>	35

4.4.2. <i>A levelek relatív víztartalmának meghatározása</i>	36
4.4.3. <i>A levélszövetek átlagos vízpotenciáljának mérése</i>	36
4.4.4. <i>Sztóma konduktancia mérése</i>	36
4.5. Elektron mikroszkópia	37
4.6. Gázcsere mérések	37
4.6.1. <i>CO<sub>2</sub> asszimilációs ráta meghatározása a fényintenzitás függvényében</i>	37
4.6.2. <i>CO<sub>2</sub> asszimilációs ráta meghatározása az intercelluláris CO<sub>2</sub> koncentráció függvényében</i>	38
4.7. Klorofill fluoreszcencia mérések	38
4.7.1. <i>Gyors klorofill a fluoreszcencia indukció (OJIP görbe) mérése</i>	38
4.7.2. <i>Modulációs klorofill a fluoreszcencia mérés, fotoprotektív folyamatok vizsgálata</i>	40
4.7.3. <i>A PSII-ben elnyelt fényenergia megoszlásának vizsgálata</i>	42
4.8. Fotoszintetikus pigmenttartalom meghatározás	43
4.9. DNS izolálás és PCR amplifikáció, PsbS és PsbA (D1) fehérjéket kódoló DNS szakaszok szekvenálása	44
4.10. Immunoblot analízis	45
4.11. Statisztikai analízis	45
<b>5. Eredmények</b>	<b>46</b>
5.1. Az elnyelt fényenergia hasznosításának összehasonlító vizsgálata a <i>S. nigrum</i> kétféle biotípusában és a különböző növénynemzedékekben	46
5.1.1. <i>A S. nigrum biotípusok és vonalak fotoszintetikus jellemzése</i>	46
5.1.2. <i>Az NPQ és az elnyelt fényenergia allokációja a PSII-ben</i>	52
5.1.3. <i>A S. nigrum vonalak sejtmagi hibrid státuszának igazolása</i>	58
5.2. A vízdeficit hatásának összehasonlító vizsgálata <i>S. nigrum</i> kétféle biotípusában és a különböző növénynemzedékekben	61
5.2.1. <i>A vízdeficit hatása a növények vízállapotára és a gázcseréjére</i>	61
5.2.2. <i>A vízdeficit hatása az elnyelt fényenergia fotokémiai hasznosítására</i>	70

5.3. Egyes nukleáris öröklődésű faktorok hatása a fotoszintetikus fényenergia hasznosításra	76
<b>6. Eredmények megvitatása</b>	<b>79</b>
<b>7. Összefoglalás</b>	<b>91</b>
<b>8. Summary</b>	<b>97</b>
<b>9. Irodalomjegyzék</b>	<b>103</b>
<b>10. Függelék</b>	<b>115</b>
<b>11. Publikációs lista</b>	<b>117</b>
<b>12. Köszönetnyilvánítás</b>	<b>119</b>

## RÖVIDÍTÉSEK ÉS JELÖLÉSEK JEGYZÉKE

$A$ [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]	$\text{CO}_2$ asszimilációs ráta
$A_{\text{max}}$	maximális $\text{CO}_2$ asszimilációs ráta
$J_{\text{max}}$	ribulóz 1,5-biszfoszfát regenerációjának maximális sebessége az $A/C_i$ görbe analízise során
AS	atrazin-szenzitív, vad-biotípusú szülő
AR	atrazin-rezisztens, D1 protein mutáns biotípusú szülő
Ant	anteraxantin
$C_a$ [ $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ]	légköri $\text{CO}_2$ koncentráció
Chl	klorofill
$C_i$ [ $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ]	sejtek közötti (intercelluláris) $\text{CO}_2$ parciális nyomása
$C_i/C_a$	látszólagos karboxilációs hatások
Cyt	citokróm
DEi	de-epoxidációs index
DH1	enyhén vízhiányos állapot 5-7 nap vízmegvonást követően (dehydration state1)
DH2	közepesen vízhiányos állapot 13-15 nap vízmegvonást követően (dehydration state2)
DH3	erősen vízhiányos állapot 18-19 nap vízmegvonást követően (dehydration state3)
F1, F2, F6	a kétféle szülő biotípus keresztezéseiből származó első, második és hatodik nemzedék
$F_o$	alapfluoreszcencia szint sötétadaptált állapotban
$F_m$	maximális fluoreszcencia szint sötétadaptált állapotban
$F'_o$	alapfluoreszcencia szint fényadaptált állapotban
$F'_m$	maximális fluoreszcencia szint fényadaptált állapotban
$F$	állandósult (steady-state) fluoreszcencia szint
Fd	ferredoxin
$F_v/F_m$	a kettes fotokémiai rendszer primer fotokémiájának maximális hatásfoka sötétadaptált állapotban
$F'_v/F'_m$	a kettes fotokémiai rendszer nyitott reakciócentrumainak relatív fotokémiai hatásfoka
$g_s$ [ $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]	sztóma konduktancia
HPLC	magas nyomású folyadék kromatográfia (High Pressure Liquid Chromatography)
IRGA	hordozható infravörös gázlemező készülék (Infrared Gas Analyzer)
LHCII	kettes fotokémiai rendszer klorofill <i>a/b</i> kötő, fénybegyűjtő pigment-protein komplexek
$J_{\text{ETR}}$ [ $\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]	lineáris fotoszintetikus elektrontranszport sebessége
$J_{\text{NO}}$ [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]	nem-regulált energia disszipáció sebessége
$J_{\text{NPQ}}$ [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]	regulált energia disszipáció sebessége
NADP	nikotinamid adenin dinukleotid foszfát
NPQ	nem-fotokémiai kioltás
OJIP	gyors klorofill fluoreszcencia tranziens, nevét a nevezetes pontok (O-J-I-P) jelölései alapján kapta
PAM	pulzus amplitudó modulált klorofill fluoriméter
PEA	fotoszintetikus hatékonyságmérő készülék (Plant Efficiency Analyzer)
PC	plasztocianin
PCR	polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)
$P_i$	inorganikus foszfát

PPFD	fotoszintetikusán aktív foton denzitás (Photosynthetically Active Photon Flux Density) (400-700 nm)
PQ	plasztokinon
PQH <sub>2</sub>	plasztokinol
PSI	egyes fotokémiai rendszer
PSII	kettes fotokémiai rendszer
P680	reakciócentrum klorofill <i>a</i> a kettes fotokémiai rendszerben
Q <sub>A</sub>	kettes fotokémiai rendszer elsődleges kinon elektron akceptora
Q <sub>B</sub>	kettes fotokémiai rendszer másodlagos kinon elektron akceptora
qE	a nem-fotokémiai kioltás energia ( $\Delta$ pH)-függő komponense
qI	a nem-fotokémiai kioltás lassan relaxálódó komponense
qT	“state” átmenet
qP	fotokémiai kioltási koefficiens
1 – qP	a kettes fotokémiai rendszerre ható gerjsztési nyomás
RC	reakciócentrum
RH1	rehidratált állapot a DH1 szakaszból 24 óra után (rehydration state1)
RH2	rehidratált állapot a DH2 szakaszból 24 óra után (rehydration state2)
RH3	rehidratált állapot a DH3 szakaszból 24 óra után (rehydration state3)
Rubisco	ribulóz 1,5-biszfoszfát karboxiláz oxigenáz
RuBP	ribulóz 1,5-biszfoszfát
RWC	relatív víztartalom (Relative Water Content)
TL	termolumineszcencia
Vio	violaxantin
Zea	zeaxantin
$\epsilon$	a Rubisco enzim aktivitása és/vagy extrahálható mennyisége (karboxilációs hatékonyság), mely az A/C <sub>i</sub> görbe lineáris szakaszának kezdeti meredeksége
$\phi$	látszólagos kvantumhatásfok: CO <sub>2</sub> asszimiláció aktinikus fényre adott válaszgörbéjének kezdeti meredeksége, mely a beeső fotonáram-sűrűségeen alapul
$\Phi_{DL}$	fényben disszipálódott hőenergia frakciója
$\Phi_{DD}$	sötétben történő energiaveszteség
$\Phi_E$	többlet energia frakció
$\Phi_{NO}$	nem-regulált (konstitutív) energia disszipáció hatásfoka
$\Phi_{NPQ}$	regulált termális energia disszipáció hatásfoka
$\Phi_{PSII}$	kettes fotokémiai rendszer fotokémiájának hatásfoka
$\Psi$ [MPa]	levél vízpotenciál

## 1. BEVEZETÉS

A növények a napok többségében ki vannak téve a fényintenzitás dinamikus változásának, és gyakran több fényenergiát nyelnek el, mint amennyit hasznosítani tudnak a fotoszintézis során. Az elnyelt többlet gerjesztési energia károsíthatja a fotoszintetikus apparátust (szingulett oxigén, reaktív oxigén fajták képződése által). Ezért a fény fotokémiai hasznosulási folyamata mellett olyan fotoprotektív mechanizmusoknak is ki kellett alakulniuk, amelyek az elnyelt energiátöbbletet veszélytelen módon elvezetik a rendszerből. Egy ilyen folyamat a nem-radiatív energia disszipáció (hődisszipáció). Ezt a mechanizmust a klorofill fluoreszcencia fényfüggő, nem-fotokémiai kioltásaként (NPQ) definiáljuk. Az NPQ legnagyobb komponense a gyorsan relaxálódó,  $\Delta\text{pH}$ -függő qE komponens. Az NPQ mechanizmusa csak részben ismert, de kialakulásának feltételei az tilakoid lumen alacsony kémhatása, de-epoxidált xantofillok képződése, PsbS és fénybegyűjtő komplex (LHC) fehérjék protonációja.

Az ez idáig vizsgált atrazin-rezisztens (AR) gyomnövényekben (*Chenopodium album*, *Epilobium adenocaulon*, *Erigeron canadensis*, *Senecio vulgaris*, *Solanum nigrum*) kimutatták a csökkent mértékű NPQ kapacitást, ezen belül a csökkent qE komponenst (Váradi *et al.*, 2003). Eddigi ismereteink szerint az NPQ kialakulását nukleárisan kódolt faktorok határozzák meg, habár a kettes fotokémiai rendszer (PSII) reakciócentrum D1 fehérjét kódoló *psbA* gén – amely a rezisztens növényekben a mutációt hordozza – a kloroplasztisz genom része. Ezért nem világos, hogy a D1 fehérje milyen hatással van az antennában végbemenő hődisszipáció kialakulására.

Reciprok keresztezéseket végeztünk a *Solanum nigrum* vad-típusú és atrazin-rezisztens biotípusai között, és az ebből származó hibridekkel (F1, F2 egészen az F6-ig) vizsgálatokat folytattunk annak érdekében, hogy közelebb jussunk annak a kérdésnek a megválaszolásához, milyen kapcsolat van a D1 protein mutáció és a PSII antennájában elnyelt fényenergia allokációja között: ezen belül tanulmányoztuk a qE komponens és az allokációs mintázat öröklődését.

Ismeretes az atrazin-rezisztens növények eltérő hőmérséklet-érzékenysége és adaptációs képessége (Ducruet & Lemoine, 1985), illetve fokozott fényérzékenysükről egyaránt beszámoltak (Hart & Stemler, 1990). Napjainkban a vízhiány (szárazság) az egyik

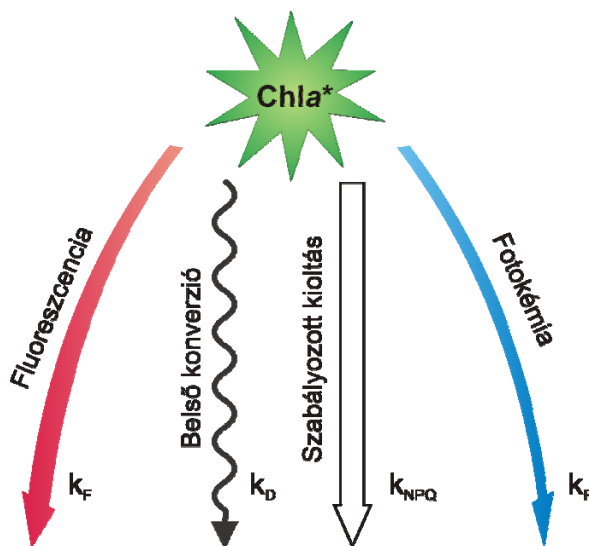
legfontosabb környezeti tényező, amely a növény növekedését/produktivitását limitálja. Természetes körülmények között a vízdeficit gyakran együtt jár a magas hőmérséklettel és/vagy a magas fotonáram-sűrűséggel (fénygátlás). Tudomásunk szerint a vízdeficit (szárazság) fotoszintézisre gyakorolt hatásait ez idáig nem vizsgálták még D1 protein mutáns növényekben. Ezért a dolgozatomban másikként a vízdeficit hatásának tanulmányozását választottam a *Solanum nigrum* gyomnövény kétféle biotípusában, annak a kérdésnek a megválaszolására, vajon a vízdeficit befolyásolja-e a D1 protein mutáns növények fitnessét.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. Az elnyelt fényenergia sorsa a fotoszintézis során

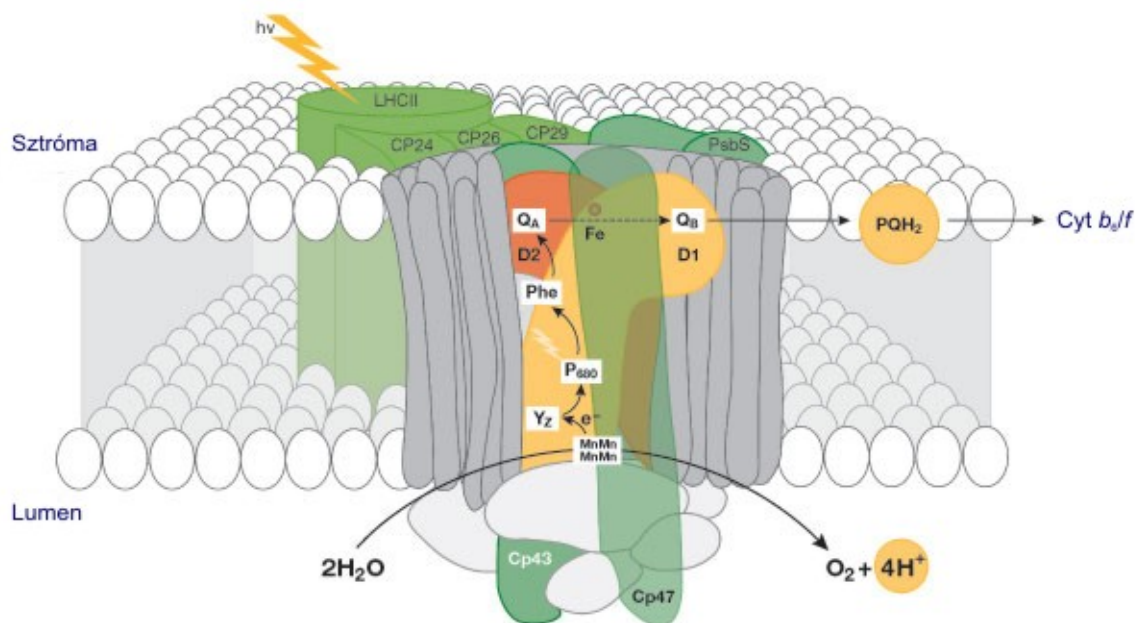
#### 2.1.1. A fény fotokémiai hasznosulása

A fotoszintézis folyamata a fény elnyelésével veszi kezdetét, amely különböző pigment molekulák segítségével valósul meg. Növényekben az elsődleges fényelnyelő pigment a klorofill *a* (Chl*a*). A fény elnyelése által a gerjesztett Chl molekula négy lehetséges úton veszítheti el a gerjesztési energiáját: alapállapotba kerülhet fotonkibocsátással (fluoreszcencia); hő formájában; részt vehet energiatranszferben, amikor is átadhatja az energiáját egy másik molekulának; vagy a gerjesztési energia kémiai reakciót eredményez (1. ábra).



**1. ábra** Egymással versengő folyamatok a PSII-ben, amelynek során egy gerjesztett állapotban lévő klorofill molekula visszatérhet az alapállapotba.

A levelek által elnyelt fényenergia eloszlásának kvantifikálása a fotoszintézis kutatás egyik fontos aspektusává vált. A különféle folyamatok, pl. fotoszintézis, fotorespiráció, víz-víz és xantofill ciklus, melyek hozzájárulnak a fotoszintetikus apparátus fotoprotekciójához, két kategóriába sorolhatók: a fotokémia és a termális disszipáció folyamatai. Miután ezek kompetitívek, a Chl fluoreszcencia hatásfokának változása alapján következtethetünk az említett folyamatok hatásfokában bekövetkező változásokra (Schreiber *et al.*, 1994), melyet a PSII (2. ábra) fotokémiai hatásfokával ( $\Phi_{PSII}$ ) és az NPQ paraméterrel jellemezzük (Genty *et al.*, 1989; Bilger *et al.*, 1995).



**2. ábra** A PSII főbb alkotórészei, a D1/D2 reakciócentrum proteinek az elektrontranszportlánc komponenseivel és a fénybegyűjtő antenna komplexek a tilakoid membránba ágyazódva J. Nield (Imperial College London, UK) nyomán.

A fotoszintézis során a növények, algák és egyes baktériumok a Napból származó fényenergiát átalakítják és azt energiában gazdag, szerves vegyületekben tárolják. A fotoszintézis folyamata két szakaszra bontható: az ún. fényszakaszban a lineáris

elektrontranszport során keletkezik az adenzin-trifoszfát (ATP) és a redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH), mely molekulák a sötétben is lejátszódó ún. sötétszakaszban a széndioxid szénhidrátokká történő biokémiai átalakításának feltételei. A NADPH legfőbb fogyasztója a CO<sub>2</sub> asszimiláció, de ezen kívül a szulfát és a nitrát redukció folyamataiban is felhasználásra kerül.

Léteznek nem asszimilációt előidéző elektrontranszport folyamatok is, melyek lejátszódásának valószínűsége megnövekedhet bizonyos körülmények között. Például a szárazság hatása napjainkban egy igen fontos környezeti tényezővé vált, melynek következtében a fokozódó sztómazáródás csökkenti a kloroplasztiszok CO<sub>2</sub> ellátását, és az oxigén felé irányuló nem-asszimilációs elektrontranszport (fotorespiráció, Mehler-reakció) valószínűsége megnövekszik. Ezek a mechanizmusok a többletenergának egy biztonságos módon történő disszipációját teszik lehetővé (Osmond & Grace, 1995). A fotorespiráció (glikolát-ciklus) (Cornic *et al.*, 1989; Renou *et al.*, 1990; Tourneux & Peltier, 1995; Flexas & Medrano, 2002), mely folyamat a C<sub>3</sub> típusú növényekre jellemző, a fotoszintézis egy lehetséges alternatív útjaként jelentős lineáris elektrontranszportot képes fenntartani, így nagymértékben biztosíthatja a többlet gerjesztési energia elvezetését. Az oxigén egyes fotokémiai rendszer (PSI) általi fotoredukciója (Mehler-reakció, Asada, 1999) úgy tűnik, csak elenyésző mértékben járul hozzá az energia-disszipáció folyamatához. Haupt-Herting és Fock (2002) fejtegetései alapján a Mehler-reakció folyamán bekövetkező fotoredukció egy nem-enzimatisz folyamat, mely függ az elektrontranszport sebességétől, és tényleges hozzájárulása a gerjesztési energia felhasználásához valószínűleg abban az esetben csökken, amennyiben pl. szárazság hatására csökken az elektrontranszport sebessége.

A PSII-n belüli ún. ciklikus elektrontranszport esetében is felvetődött az a lehetőség, hogy hozzájárulhat a többlet gerjesztési energia eltávolításához (Chow, 1994; Whitmarsh *et al.*, 1994), jóllehet *in vivo* létezése meggyőző módon nem bizonyított. Ebben a folyamatban valószínűleg részt vesz a D1/D2 reakciócentrumhoz (RC) szorosan kötődő citokróm *b*<sub>559</sub> heterodimer fehérje, ami feltevések szerint aktuális redoxpotenciáljától függően a RC Chl (P680<sup>+</sup>) donoraként vagy a feofitin akceptoraként funkcionálhat, ekképpen védheti a PSII-t a fénykárosodástól (Whitmarsh *et al.*, 1994). A PSI körüli ciklikus elektrontranszport során a redukált ferredoxin (Fd) molekula elektront ad át a citokróm (Cyt) *b*<sub>6</sub>/*f* komplex kitüntetett helyén kötődő kinon vagy szemikinin molekulának, melynek eredményeként a Cyt *b*<sub>6</sub>/*f* részt

vesz a tilakoid membránon keresztüli  $\Delta pH$  létrehozásában és fenntartásában. E mechanizmusról ugyancsak feltételezik, hogy fontos szerepet tölt be a fotoprotekcióban (Heber & Walker, 1992). Minthogy a ciklikus elektrontranszport során NADPH nem keletkezik, a tilakoid membránon keresztüli proton gradiens másfelől ATP szintézist indukál, ez a folyamat ATP/NADPH arány regulációjára szolgál.

### *2.1.2. A többlet elnyelt fényenergia sorsa és káros hatásai a növények leveleiben*

A növények a természetben gyakorta ki vannak téve a fényintenzitás rapszodikus változásának, így olykor több fényenergiát nyelnek el, mint amennyit hasznosítani képesek fotoszintézisük során. Az elnyelt fényenergia mennyiségének növekedésével a fotoszintetikus teljesítmény – amelyet a genetikai adottságon túl az adott élőhelyen a növényt érő fényintenzitás-maximumok határoznak meg – egy telítési fázisig képes növekedni, míg a beeső fény elnyelése továbbra is lineárisan növekszik. A leveleket érő napsugárzás kb. 80%-át nyelik el a fotoszintetikus pigment molekulák (Björkman & Demmig, 1987), míg az energia kisebb hányada reflektálódik a levelek felszínéről, vagy áteresztik azt a levél szövetei. Az abszorpció révén a pigment molekulákban kialakult gerjesztett állapot energiája a töltésszétválasztást követően fotokémiai reakciót eredményezhet. A fotoszintézis során nem hasznosuló többlet energia frakció a növényekben kialakult fotoprotektív mechanizmusok működése során eliminálódik. A gerjesztési energiatöbblet ezek után is megmaradó része krónikus károsodást okozhat a fotoszintetikus apparátusban, amihez az is hozzájárul, hogy a PSII működése során molekuláris oxigén fejlődik, ami a megnövekedett mennyiségű, hosszabb élettartamú triplett gerjesztett állapotú Chl *a* molekulákkal ( $^3Chl a^*$ ) kölcsönhatásba lépve szingulett oxigén képződést eredményez. Kimutatták ezenkívül más reaktív oxigén formák, mint például a szuperoxid-gyökanion, hidroxil-gyök, hidrogénperoxid, illetve egyéb szerves gyökök képződését is. Mindezek a tilakoid membrán irreverzibilis, oxidatív károsodásához (fénygátlás) vezethetnek (Hurry *et al.*, 1996), valamint pigment-, ill. fehérje-degradációt okozhatnak (Andersson & Barber, 1996; Aro *et al.*, 1993). Hatástalanításuk érdekében számos antioxidáns molekula és enzimszisztéma működik a kloroplasztisban, amelyek képesek befogni a fotoszintézis által szükségszerűen termelt reaktív oxigén formákat (Asada, 1994; Foyer *et al.*, 1994; Polle, 1997).

### 2.1.3. A fény káros hatásaival szemben kialakult fotoprotektív mechanizmusok

A természetben a növényeknek alkalmazkodniuk kell a fény intenzitásának és spektrális tulajdonságainak gyakori változásához. Az evolúció során többszintű adaptációs hálózat alakult ki, amelynek segítségével a fotoszintetizáló organizmusok megbirkóznak a fényviszonyok fluktuációjával. Ezek két csoportba sorolhatók: (i) a fényelnyelés szabályozásával és (ii) a befogott fényenergia sorsával kapcsolatos adaptációs mechanizmusok. A teljes egyed szintjén megvalósuló adaptáció például a levél-orientáció szabályozása (Björkman & Powles, 1987). Ez néhány, árnyék típusú, alacsony fotoszintetikus kapacitással bíró növény esetében igen hatékonyan működik, melyek egyszer-egyszer ki vannak téve a közvetlen napsugárzásnak. A sivatagi növények egy része szervesetlen anyagokat (pl. sókristályok) halmoz fel a levélfelületén, vagy levegővel töltött szűrőket fejleszt, hogy növelje a levél reflexióját, ezáltal csökkentve az elnyelt fény mennyiségét. Sejt szinten a fényelnyelést a kloroplasztiszok mozgása szabályozhatja (Chow *et al.*, 1988), mely relatíve gyorsan, percek alatt valósul meg, de csupán kb. 10-20%-kal csökkenti azt (Brugnoli & Björkman, 1992).

A molekuláris szintű adaptációs mechanizmusok gyakran összetett, fényfüggő génexpresszió szabályozás eredményei, melyek transzkripciós, translációs és poszt-transzlációs szinteken valósulnak meg (Kloppstech, 1997). E folyamatok napokat, heteket vehetnek igénybe és a tilakoid membrán szintjén jelentős összetételbeli és szerkezeti változásokat foglalnak magukban. Egy ezek közül a PSI és PSII antenna méreteinek fény általi módosulása, mely egy igen konzervált jelenség (Anderson *et al.*, 1995). Magas fényintenzitás mellett nőtt növényekben az antennaméret mindig kisebb, mint az árnyéknövényekben. A fényviszonyoktól függően megváltozik az egy RC-ra jutó, külső fénybegyűjtő komplexek (LHC) mennyisége, ezáltal megváltozik az adott fotokémiai rendszer abszorpciós hatáskeresztmetszete. Egy másik, hosszútávú akklimatizációs módosulás a PSI és PSII arányának változása, és a PSII RC-ok szubpopulációjának inaktiválódása (Anderson *et al.*, 1988; Melis, 1991). Például az erdő lombkoronája által megszűrt fényben (több távoli vörös fény) nőtt árnyéknövények nagyobb PSII/PSI aránnyal bírnak, ezzel kompenzálva a vörös fény kisebb mennyiségét, mely a PSII gerjesztéséhez szükséges (Anderson & Osmond, 2001).

A rövidtávú adaptációk, melyeket génexpresszió változások nem kísérik, másodperceken és percekben belül mennek végbe, és semlegesítik a fényviszonyok gyors változásainak hatásait, úgymint a diurnális változások a fény mennyiségében és minőségében, az időjárás által előidézett pillanatnyi fluktuációk, és a lombzat általi fényszűrés (Anderson & Osmond, 2001). A legjobban dokumentált adaptáció, amely "state" átmenetként (qT) ismert (Bonaventura & Mayers, 1969), perces időskálán mozog, működése alacsony/közepes fényintenzitások mellett hatékony, pl. akkor, amikor a fényintenzitás nem limitálja a fotoszintézist (Horton & Hague, 1988). A plasztokinon (PQ) készlet (Horton, 1981; Allen *et al.*, 1981) és a Cyt *b* (Gal *et al.*, 1987) redoxállapotai mintegy szenzorként/jelátalakítóként működnek és egy protein kináz aktivációjában vesznek részt (Bennett, 1977; 1979). A PSII-nek a PSI-hez képest mutatózó viszonylagos túlgerjesztése során ez a kináz néhány LHCII komplexet foszforilál (ún. mobil LHCII) (Mullet, 1983), melyek ledisszociálnak a PSII-ről, csökkentve az antenna tényleges méretét, és az elnyelt energiát a PSI felé továbbítják.

A PSII hatékonyságának szabályozása (Weiss & Berry, 1987; Genty *et al.*, 1989) reverzibilisen, nem-lineárisan függ a fényintenzitástól, holott a nyitott RC-ok száma és a PSII hatásfoka között lineáris összefüggést feltételeztek. A linearitástól való eltérés legésszerűbb magyarázata az, hogy a PSII antennában megnyílik egy csatorna, mely a többlet gerjesztési energia disszipációját lehetővé teszi. Ez Chl fluoreszcencia mérésekkel, az ún. fluoreszcencia kioltás analízis módszerével nyomonkövethető, pl. pulzus amplitúdó modulációs (PAM) technikával (Schreiber, 1986). Az analízis egyik paramétere, az NPQ, a többlet energia disszipációjának nagyságát méri a PSII-ben zárt RC-ok esetében. A PSII hatásfoka fordított lineáris összefüggést mutatott az NPQ-val (Genty *et al.*, 1989). Eszerint a PSII hatásfokát egy nem-radiatív energia disszipáció, NPQ-alapú folyamat kontrollálhatja, melyet a tilakoid membránon keresztül felépülő proton gradiens ( $\Delta pH$ ) vált ki (Oxborough & Horton, 1988).

#### 2.1.4. A nem-fotokémiai kioltás és lokalizációja magasabbrendű növényekben

Többlet fényenergia elnyelése esetén a csökkent fotokémiai kioltás a szingulett gerjesztett Chl *a* ( $^1Chl a^*$ ) élettidejének és a triplett Chl *a* ( $^3Chl a^*$ ) keletkezés valószínűségének megnövekedéséhez vezet a spinváltó átmenet során. A  $^3Chl a^*$  reakcióba lép az alapállapotban triplett oxigénnel ( $^3O_2$ ) és reaktív oxigén formákat hoz létre, amelyek elősegítik a

fotoinhibíció és az oxidatív stressz kialakulását (Barber & Andersson, 1992). E károsító folyamatok ellensúlyozására fotoprotekciós mechanizmusok inicializálódnak, melyek eliminálják a reaktív oxigén formákat (Asada, 1999) vagy a  $^1\text{Chla}^*$  disszipációján keresztül megakadályozzák ezek létrejöttét (Niyogi, 2000; Külheim *et al.*, 2002). Ez utóbbit a Chla fluoreszcencia fényfüggő, nem-fotokémiai kioltásaként definiáljuk.

Általában az NPQ-t technikailag három komponensre osztják a relaxációs kinetikáikat alapul véve: a relaxáció gyors (qE), közepes (qT), és lassú (qI) fázisai szerint (Horton & Hague, 1988), melyek az energiafüggő kioltásnak, a “state” átmenetnek, és a fotoinhibíciós kioltásnak tudhatók be (Quick & Stitt, 1989). Az első komponens, a visszacsatolós gerjesztési energia lecsengetés (qE) reverzibilis, gyorsan aktiválódik a növekvő fényintenzitással, és gyorsan, tíz perc, relaxálódik a sötétben, amely mind közül a legjobban tanulmányozott folyamat. E folyamat lehetővé teszi a többlet gerjesztési energia hőként való disszipációját, ezáltal védelmet nyújtva a fotoszintetikus pigmentek, fehérjék és lipidek fotooxidációja és károsodása ellen, mely folyamat különben a fotoszintézis fotoinhibícióját/fotoinaktivációját okozhatná, illetve, mely folyamat a növények produktivására, fitneszére jelentős befolyással bír természetes körülmények között (Krivosheeva *et al.*, 1996; Ögren & Rosenqvist, 1992; Ögren & Sjöström, 1990). A kioltás e típusa egy finoman szabályozott folyamat, amelyben a fő szabályozó tényezők a kloroplasztisz tilakoid membránon keresztül kiépülő proton gradiens ( $\Delta\text{pH}$ ) (Wraight & Crofts, 1970; Briantais *et al.*, 1979), a xantofill ciklus, azaz a violaxantin (Vio) konverziója anteraxantinná (Ant) és zeaxantinná (Zea) (Demmig *et al.*, 1987; Demmig-Adams, 1990; Demmig-Adams & Adams, 1992; Niyogi *et al.*, 1997), és a PsbS fehérje, amely a két, lumen felőli protonálható csoportja (E122 és E226) révén érzékeli az alacsony lumenális pH-t (Funk *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2000; 2004; Niyogi *et al.*, 2005). Chlb illetve Lhc fehérje hiányos mutánsok, vagy olyanok, melyekben módosult a PSII antenna struktúra szerveződése, erőteljes NPQ csökkenést mutatnak, amely bizonyítja az antenna fehérjék szerepét az NPQ aktiválásában (Briantais, 1994; Kovács *et al.*, 2006; de Bianchi *et al.*, 2008).

Az NPQ tényleges molekuláris mechanizmusa nem ismert, jóllehet számos hipotézis és feltételezett kioltó (quencher) létezik: energia transzfer Chl-ról Zea-ra az LHCII-ben (Frank *et al.*, 2000); elektrontranszfer egy karotinoidról Chl-ra létrehozván egy Zea-Chl vagy lutein (Lut)-Chl töltés transzfer állapotot (Holt *et al.*, 2005; Avenson *et al.*, 2009); direkt vagy

indirekt kioltás a PsbS fehérje által (Li *et al.*, 2000; Niyogi *et al.*, 2005); energia transzfer Chl-ról Lut-re az LHCII-ben (Horton *et al.*, 1991; Ruban *et al.*, 2007) az LHCII aggregáció vagy konformáció változásához kapcsolódva; valamint az LHCII aggregációja által kialakult távoli vörös fényt kibocsátó kioltó Chl-Chl töltés transzfer állapot (Miloslavina *et al.*, 2008). Egyesek feltételezik a PSII RC kioltás meglétét (Finazzi *et al.*, 2004; Ivanov *et al.*, 2008), amit a Zea-független kioltás egy további típusaként tartanak számon. Néhányan úgy vélik, hogy a Lut általi kioltás a Zea-függő kioltás kiegészítőjeként funkcionálhat (Niyogi *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2009). Johnson és munkatársai (2009) munkája azt az elképzelést támogatja, hogy mind a Zea-független, mind a Zea-függő kioltás a PsbS-függő mechanizmusból ered, amelyet a Zea modulál (Crouchman *et al.*, 2006).

Míg a gyorsan relaxálódó qE jól jellemzett, a lassabb qT és qI fázisok még mindig vitatottak, és gyanítják, hogy talán több, mint egy mechanizmus is hozzájárulhat a kialakulásukhoz. A qI-t hagyományosan a PSII fotoinhibíciójának tulajdonították (Somersalo & Krause, 1988), mely összefüggésben van a fotokémiai rendszer koordinált degradációjával és helyreállításával (Powles & Björkman, 1982; Kyle, 1987; Krause, 1988; Aro *et al.*, 1993; Long *et al.*, 1994; Murata *et al.*, 2007). Később széles körben elfogadottá vált, hogy a legtöbb esetben a fotoinhibíció alacsony mértékű, és a qI a qE-hez hasonlóan a gerjesztési energia hődisszipációjából származik. Különböző hipotézisekkel próbáltak magyarázatot találni a qI látszólagos irreverzibilitására: tartós transzmembrán  $\Delta pH$  (Gilmore & Yamamoto, 1992), stabil fehérje protonáció (Horton *et al.* 1994), inaktív PSII RC-ok felhalmozódása (Briantais *et al.*, 1992; Schansker & van Rensen, 1999), vagy a Zea stabil kötődése a CP29 proteinhez (Färber *et al.*, 1997).

A qT komponens “state” átmenettel való kapcsolatát néhányan szintén megkérdőjelezzik, és manapság úgy vélik, hogy a PSI-ről PSII-re történő, az energia újraeloszlása magas fényintenzitás esetén elhanyagolható (Walters & Horton, 1991; 1993), illetve a qT-nek más eredetet feltételeznek (Schansker *et al.*, 2006).

Az NPQ mechanizmusát tekintve számos ellentmondásos bizonyíték létezik. Még tisztázásra vár, hogy vajon a fényindukált, reverzibilis NPQ a de-excitáció egyetlen mechanizmusát képviseli-e egyetlen helyen, melyet a PsbS és a Zea kombinált működése idéz elő (Johnson *et al.*, 2009), vagy több párhuzamos és nagyrészt független mechanizmust foglal magában, melyek a PSII antenna különböző részein működnek. Különböző antenna

komplexek szisztematikus eliminációja az NPQ kapacitás csökkenéséhez vezet (Andersson *et al.*, 2001; 2003; Kovács *et al.*, 2006), jóllehet az NPQ még a megszakított (intermittent) fény körülmények mellett nevelt, Chlb hiányos mutáns növényekben sem tűnt el egészen, amikor csupán a PSII “core” komplex felhalmozódása figyelhető meg (Härtel & Lokstein, 1995; Härtel *et al.*, 1996). Egy újabb modell szerint az NPQ-nak legalább három független mechanizmusa vagy helye létezik (Lambrev *et al.*, 2010). Betterle és munkatársai (2009) feltételezik, hogy egy antenna hetero-oligomer fényindukált disszociációja szükséges az NPQ kialakulásához, mely két monomer Lhcb fehérjét (CP29 és CP24) és a trimer LHCII-M (közepesen kötött, M) komplexet tartalmazza.

Általánosan az a nézet terjedt el, hogy az NPQ az LHCII-ben lokalizálódik (Horton *et al.*, 1996). Ezt támasztják alá a következő megfigyelések: a kioltás összefüggésben van az antenna fluoreszcencia szignifikáns csökkenésével, miközben valamennyi RC nyitott állapotban van ( $F_0$ ) (Horton & Ruban, 1993), amely folyamat 77K hőmérsékleten tovább tart, és az LHCII-ből származó kioltott fluoreszcencia sávokkal van kapcsolatban (Ruban *et al.*, 1991); leveleken mért időfelbontásos fluoreszcencia adatok is alátámasztják az antennában végbemenő kioltást (Genty *et al.*, 1992); hőemisszió direkt mérésével NPQ körülmények mellett kimutatták, hogy ez 1,4  $\mu$ s-on belül megy végbe, mely sokkal gyorsabb, mint a PSII-ben bekövetkező rekombinációs folyamatok becsült sebessége (Mullineaux *et al.*, 1994); keresztkötő vegyületek blokkolják az NPQ-t, valamint az izolált LHCII komplexek átszerveződését, ami elősegíti a hődisszipáció kialakulását (Iliescu *et al.*, 2008); az NPQ és az LHCII azonos módon reagál számos tényező esetében: antimicin A, tercier aminok és magnézium ionok hatására (Noctor *et al.*, 1993; Ruban *et al.*, 1994); az NPQ igen nagymértékben függ a kizárólagosan LHCII-kötött xantofilloktól, a Lut-tól és a Zea-tól (Ruban *et al.*, 1994; Niyogi *et al.*, 2001). Horton és munkatársai (2005) hipotézise szerint az LHCII-ben lokalizálódó qE Chl-Chl és/vagy xantofill/Chl kölcsönhatásokat foglal magában. E modell az LHCII négy különböző strukturális/funkcionális állapotát írja le – nem-protonált és protonált állapotok, Vio vagy Zea kötődése mellett. E jelenlegi aggregációs modell állítása szerint az NPQ a PSII antenna makrostruktúrájától függ, semmint egyetlen fehérjétől. Az LHCII fehérjék egzakt szupramolekuláris rendezettsége mintegy előfeltétele lehet az energiafüggő kioltásnak. A xantofill ciklus pigmentek nagyobb része inkább gyengén kötődhet a trimer LHCII-höz. A xantofill ciklus karotinoidokat allosztérikus szabályozóknak vélik,

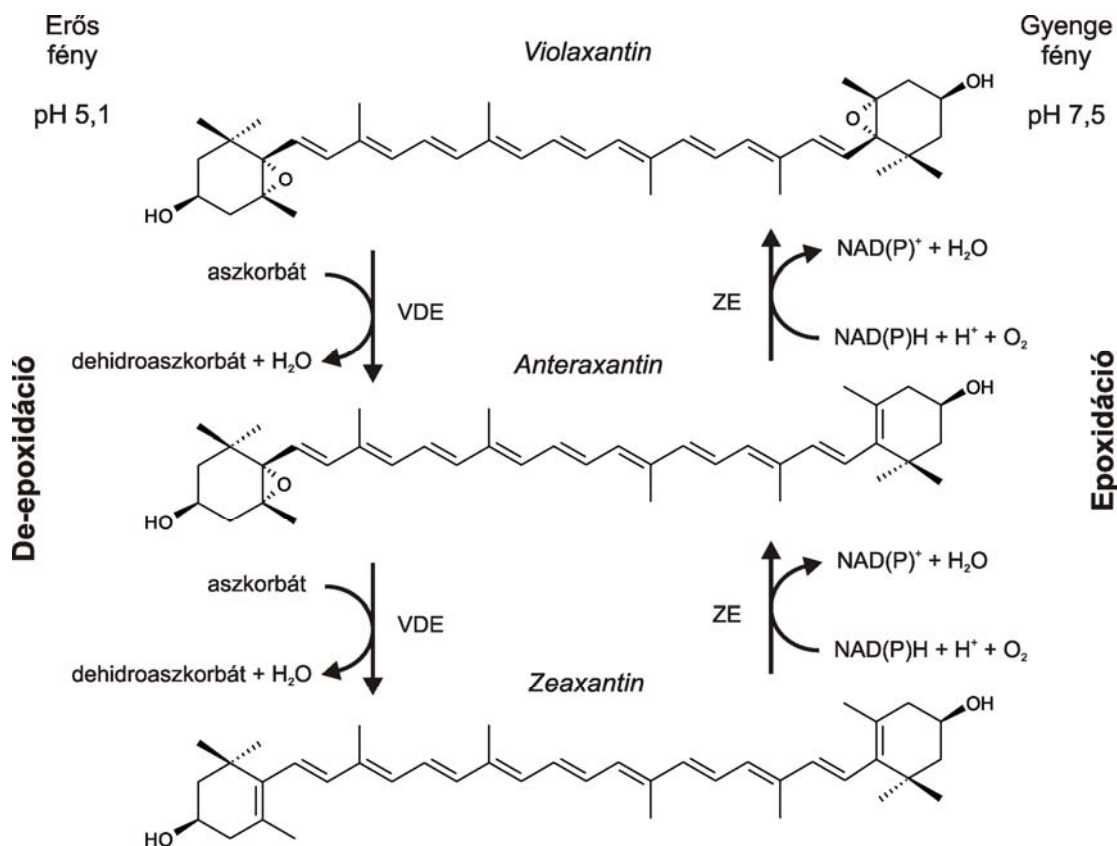
melyek a fénybegyűjtő komplexek periferiális allosztérikus oldalaihoz kötődnek (L2, V1 helyek) (Horton *et al.*, 2005).

#### 2.1.5. A xantofilok szerepe a hődisszipáció folyamatában, a xantofill ciklus-függő és független nem-fotokémiai kioltás

A PSII antenna egy magasan szervezett, dinamikusan működő rendszer, mely képes a RC-hoz érkező gerjesztés mennyiségét összehangolni a fiziológiai szükséglettel (Horton *et al.*, 1996). Az energiaáramlás szabályozása a többlet gerjesztés hődisszipációján keresztül valósul meg a PSII antennájában. Az *in vivo* kialakuló maximális qE kapcsolatban van az epoxi-xantofill violaxantin anteraxantinon keresztüli zeaxantinná való enzimatis de-epoxidációjával a xantofill ciklus működése során (3. ábra) (Demmig-Adams, 1990). A fotokonvertibilis xantofill ciklus pigmentek legnagyobb része a trimer LHCII-höz kapcsolódik a külső V1 kötőhelyen (Ruban *et al.*, 1999; 2002a; Caffarri *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004). A trimer LHCII két, más típusú xantofillt is köt internálisan: két luteint az L1 és L2 helyeken és egy neoxantint az N1 helyen (Liu *et al.*, 2004).

Úgy tartják, két eltérő kioltási mechanizmus létezik, az egyikben (I. típus) a Zea, a másikban (II. típus) a Lut a közreműködő. Úgy gondolták, hogy az I. típusú mechanizmusban a qE obligát módon függ a Zea-tól, mely mintegy a gerjesztett Chl kioltójaként működik a töltés transzfer állapot kialakulása során. Az I. típus meglétére az a megfigyelés szolgált bizonyítékkal, hogy egy, kb. 1000 nm-nél elnyelő, karotinoid gyök kation kialakulása kölcsönös összefüggést mutatott a qE mértékével (Holt *et al.*, 2005). Újabban úgy tartják, hogy a Zea gyök kation kialakulása kizárólagosan a minor antenna komplexek L2 kötőhelyén megy végbe (Ahn *et al.*, 2008; Avenson *et al.*, 2008), a kioltáshoz így a Zea reverzibilis beillesztése szükséges ebbe a belső környezetbe. Mivel úgy találták, hogy e kation igen csekély mértékben hat a minor antenna komplexek gerjesztett-állapot életidejére, felmerült az, hogy *in vivo* a komplexek nagyszámban vehetik fel azt a konformációt a  $\Delta pH$  kialakulásának eredményeként, amelyben ez a kation képes kialakulni (Avenson *et al.*, 2008). Igazolták továbbá azt is, hogy a Zea gyök kation a trimer LHCII-ben is létrejöhet (Amarie *et al.*, 2007). Mivel azonban a Chl<sub>a</sub> gerjesztett-állapot életidejére ez a hatás igen csekélynek bizonyult, arra

jutottak, hogy az I. típusú mechanizmus nem lehet felelős a qE kialakulásáért (Amarie *et al.*, 2007; Dreuw & Wornit, 2008).



**3. ábra** A xantofill ciklus komponensei. A fotokémiai telítési fényintenzitást meghaladó erősségű megvilágítás hatására a de-epoxidáz enzim működésbe lép és két lépésben eltávolítja a lánc végi oxigén atomokat, ezáltal megnövelve a konjugált kettős kötések számát (9-ről 11-re). A de-epoxidáció percek alatt lezajlik, míg a fordított irányú folyamat (epoxidáció) ennél lassab, több percet, esetleg órát vesz igénybe.

A II. típusú mechanizmus esetében a qE az LHCII fehérjék egy belső sajátsága; a fehérje konformációjának változása módosítja a kötött pigmentek konfigurációját, valamint az L1 helyen kötött xantofill (rendes körülmények között Lut) hatékony kioltóvá válását

eredményezi (Ruban *et al.*, 2007; Iliaia *et al.*, 2008). A II. típusú mechanizmus létezése a trimer LHCII aggregátumok tanulmányozása révén nyert bizonyosságot (Ruban *et al.*, 2007), melynek folyamán arra a következtetésre jutottak, hogy az energia disszipáció a Chla-ról az L1 helyen kötődő Lut felé történő energiáttranszferrel valósul meg. Ez a kioltási mechanizmus olyan mértékben csökkenti a Chla gerjesztett-állapot életidejét, mely teljes egészében magyarázatul szolgálhat a qE-re *in vivo*. Egy másik LHCII kötött xantofill (neoxantin) konformációjában bekövetkező változás kölcsönösen összefügg a kioltás mértékével. Ez a konformáció változás olyan sebességgel megy végbe *in vivo*, amely a qE nagyságával korrelációt mutat. A Horton és munkatársai (1991; 2005) által javasolt II. típusú kioltási modellben a Zea nem kioltóként, hanem mintegy allosztérikus regulátor működik, amely a belső LHCII kioltási folyamat  $\Delta pH$  érzékenységét szabályozza.

Habár az I. és II. típusú mechanizmusok az LHCII-n belül eltérő helyeken található xantofilokat foglalnak magukban, hasonlóságok is vannak közöttük: úgy hiszik, mindkét folyamat magában foglal egy  $\Delta pH$  által kiváltott, PsbS fehérje által mediált konformáció változást (Ruban *et al.*, 2007; Ahn *et al.*, 2008). Valószínűleg mindkét mechanizmus hozzájárulhat az *in vivo* qE kialakulásához, mivel a folyamat végbemegy mind Zea jelenlétében, mind hiányában (Adams *et al.*, 1990; Crouchman *et al.*, 2006). A sötétadaptált levelek megvilágítása során kialakuló NPQ kinetikája két komponensből áll: az első gyorsan kialakul és Zea független; a második, lassabb komponens korrelál a Vio de-epoxidációval és ezért Zea-függőnek mondhatjuk (Adams *et al.*, 1990; Ruban & Horton, 1999). Az NPQ mindkét komponense qE típusú: gyorsan relaxálódnak a sötétben (Adams *et al.*, 1990), mindkettő függ a PsbS-től (Li *et al.*, 2000), és mindkettőt fokozza a PsbS túlexpressziója (Li *et al.*, 2002b; Crouchman *et al.*, 2006).

Az 535 nm-en mért abszorpció változásról ( $\Delta A_{535}$ ) úgy tartják, hogy a PSII antennában végbemenő konformáció változásból ered, mely a kioltott állapot kialakulását kíséri (Ruban *et al.*, 1993b; Bilger & Björkman, 1994). Johnson és munkatársai (2009) úgy találták, a  $\Delta A_{535}$  érzékeny mind a monomer minor, mind a trimer LHCII fehérjék elvesztésére. Tehát a  $\Delta A_{535}$  összefüggést mutatott mind a Zea-függő, mind a Zea-független qE komponensekkel, ez utóbbiban a rövidebb hullámhosszak felé való elmozdulásban a xantofilok részvétele tükröződik. Ezek az eredmények (Johnson *et al.*, 2009) a korábbiakkal együtt, bizonyítani látszanak a Lut fontosságát a maximális, teljes qE kialakulásában (Pogson *et al.*, 1998; Pogson

& Rissler, 2000). Feltételezik, hogy a Lut hiányában a PSII antennafehérjék szerkezetében bekövetkező destabilizáció (Lokstein *et al.*, 2002; Havaux *et al.*, 2004), az egyes monomerek szintjén, hátrányosan befolyásolja a kioltott állapot kialakulásához vezető konformáció változások létrejöttét. Az *npq2* és *lut2npq2* mutáns *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) növényekben a Zea konstitutív jelenléte a  $\Delta A_{535}$  amplitudójának növekedését eredményezte, miközben *lut2npq2* mutánsokban ezt a növekményt a qE csökkenése kísérte (Johnson *et al.*, 2009). Ez az eredmény, egyetértésben mások megfigyelésével (Kalituho *et al.*, 2006), arra enged következtetni hogy az abszorpció változás nem tükrözi közvetlenül egy kioltó molekula kialakulását. Ezért a  $\Delta A_{535}$  abszorpció változásról Johnson és munkatársai (2009) úgy tartják, hogy az azokat a szerkezeti változásokat jeleníti meg, melyek összefüggésben vannak a qE Zea általi felerősödésével. Igazoltnak látszik tehát, hogy mind a Zea-független, mind a Zea-függő qE komponens egyazon mechanizmusból származik a PSII antennájában. Mindkettő preferenciálisan az LHCII fluoreszcencia emissziós sávokat oltja ki (Ruban *et al.*, 1991), valamint mindkét qE komponens amplitudója kisebb volt Lut hiányában (Pogson *et al.*, 1998; Niyogi *et al.*, 2001). A monomer minor és a trimer LHCII fehérje-összetétel módosítása befolyással bír mindkét mechanizmusra, és mindkét folyamatot konformáció változások kísérték, melyek hatására nagyon hasonló abszorpció változásokat tapasztaltak a Soret régióban (Johnson *et al.*, 2009). Úgy hiszik, hogy ezek a megfigyelések megfelelnek a II. típusú mechanizmusnak, amely magában foglalja az LHCII konformáció változása által aktivált L1 helyen kötődő xantofillt, mely változás a neoxantin eltorzulásához vezet (Ruban *et al.*, 2007), valamint a V1 hely de-epoxidációs állapota ezt mintegy allosztérikus szabályozza (Horton *et al.*, 2005). Ez a folyamat feltételezések szerint néhány vagy minden Lhcb tartalmú antennakomplexben bekövetkezik (Ruban *et al.*, 1996; Mozzo *et al.*, 2008). Johnson és munkatársai (2009) lehetséges alternatívája értelmében az I. típusú mechanizmus előfordulhat mind a trimer LHCII, mind a monomer minor antennában, illetve a Zea hiányában a Lut kation foglalhatja el a helyét kioltóként.

#### 2.1.6. A PsbS fehérje szerepe a hődisszipáció folyamatában

A sejtmagi *npq4* gén által kódolt PsbS fehérje egy 22 kDa tömegű PSII alegység, amely a fénybegyűjtő komplex család tagja, és ami Zea-kötő tulajdonsággal is rendelkezik (Jansson,

1999). A PsbS fehérjének, a legtöbb LHC fehérjétől eltérően, melyek három transzmembrán hélixet tartalmaznak, négy transzmembrán hélice van, valamint pigmentkötő tulajdonságai is eltérnek más LHC fehérjékétől.

Az *npq4* deléciós mutáns *A. thaliana* növényekben a PsbS fehérje teljesen hiányzik. Ezekben a mutánsokban a qE nem alakul ki 5-10 perc megvilágítás után, azonkívül a jellegzetes  $\Delta A_{535}$  szintén hiányzott e mutánsokból (Li *et al.*, 2000; Ruban *et al.*, 2002b). E növények megnövekedett fényérzékenységet fotoinhibíciós körülmények között (Li *et al.*, 2002a), valamint csökkent növekedésüket és magprodukciójukat (Külheim *et al.*, 2002) a qE látszólagos hiányának tudták be.

A PsbS fehérjéről feltételezték, hogy a tilakoid membránban, a qE kialakulásának helyén kulcsfontosságú, fotoprotektív szerepet tölt be (Li *et al.*, 2000; 2004), később pedig azt, hogy mind a  $\Delta pH$  érzékelőjeként (Dominici *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004), mind a vélelmezett karotinoid Zea kioltó kötőhelyeként működik (Li *et al.*, 2004). Azonban ez a teória később megkérdőjeleződött, mivel a PsbS protein Zea hiányában is betöltötte funkcióját (Crouchman *et al.*, 2006), és a rekonstituált fehérje nem kötött semmilyen pigmentet (Dominici *et al.*, 2002; Bonente *et al.*, 2008). Az *npq4 A. thaliana* mutánsok levelein és izolált kloroplasztiszain végzett kísérletek alapján Horton és munkatársai (2000) azt az alternatív magyarázatot javasolták, hogy a PsbS fehérje indirekt módon, mintegy a konformáció változások modulátoraként működik, előidézve az LHCII-n belüli kioltást. Egyesek azt feltételezik, hogy a  $\Delta pH$  kialakulásának következtében a PsbS oligomerizációs állapota megváltozhat és ezáltal áthelyeződhet a tilakoid membránban (Bergantino *et al.*, 2003; Teardo *et al.*, 2007). Mások szerint a PsbS hatással lehet a tilakoid membrán dinamikára, összefüggésben a gránum szerkezet kialakulásával ("stacking") és a PSII-LHCII komplexek makroorganizációjával (Kiss *et al.*, 2008; Betterle *et al.*, 2009). Tehát az elmúlt évek kutatásai alapján úgy tűnik, a PsbS fehérje szerepet játszhat a  $\Delta pH$ -érzékeny NPQ beindításában, lehetővé téve egy vagy több LHCII antennafehérje szerkezeti változását, amely az NPQ állapot indukciójához szükséges (Horton *et al.*, 2000; 2008; Dominici *et al.*, 2002; Teardo *et al.*, 2007; Kiss *et al.*, 2008; Betterle *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2009). Legújabbban Johnson és Ruban (2010) kimutatták, hogy az *npq4* növények kompetens fotoprotektív energia disszipációs mechanizmussal bírnak, azonban ez jóval lassabban alakul ki és relaxálódik, mint a vad típusban. E mutánsok leveleiben a meghosszabbított megvilágítás/sötétség hatására a vad

típushoz rendkívül hasonló változásokat figyeltek meg a kulcs fluoreszcencia kioltási paraméterek és a  $\Delta A_{535}$  abszorpció változás tekintetében. Ezenfelül mások úgy találták, hogy az NPQ kialakulását és relaxációját a PsbS meggyorsítja a túlexpresszált vonalakban a vad típushoz képest (Crouchman *et al.*, 2006). Kimutatták, hogy a  $\Delta A_{535}$ , mely a vörös-eltolódott Zea szubpopuláció kialakulásából származik az NPQ alatt (Ruban *et al.*, 1993a; 2002), nem igényel PsbS-t. A Zea szubpopuláció lehetséges eredete azonban ma még egy nyitott kérdés. Johnson és Ruban (2010) kutatási eredményei rávilágítottak arra, hogy a kioltó nem a PsbS-en lokalizálódik; az NPQ a fehérje hiányában is kialakul, ekképpen a  $\Delta pH$ -t a tilakoid membrán még mindig érzékeli, valószínűleg bizonyos LHCII fehérjék savas csoportjai által, melyeket diciklohexilkarbodiimid kötőhelyekként azonosítottak (Walters *et al.*, 1994; 1996). Ezek szintén azt a nézetet támogatják, mely szerint az LHCII és/vagy a minor antenna fehérjék az NPQ helyeként funkcionálhatnak (Ruban *et al.*, 2007; Ahn *et al.*, 2008). A PsbS fehérje qE kialakulásában betöltött kinetikai szerepének pontos mechanizmusa jelenleg még nem ismert. Johnson és Ruban (2010) az *npq4* növényekben a megváltozott NPQ kinetika elsődleges okának a rigidebb és kevésbé flexibilis PSII makroorganizációját (Kiss *et al.*, 2008; Betterle *et al.*, 2009) tekintik, mely támogatja azt az elképzelést, hogy a PsbS egy dinamikai szerepet játszik a tilakoid membrán szerveződésében (Teardo *et al.*, 2007). E nézet szerint a PsbS lokalizációja megváltozhat az NPQ állapotban, előidézően bizonyos obligát változást a PSII makroorganizációjában (Betterle *et al.*, 2009), mely ellenkező esetben inkább lassú lenne; avagy a PsbS mintegy vektor működhet, amely a protonokat az LHCII fehérjék felületén koncentrálja, ezzel elősegítve azok NPQ állapotba való gyors átkapcsolását.

## **2.2. A vízdeficit hatása a magasabbrendű növények fotoszintézisére**

### *2.2.1. A vízhiány fokozatainak jellemzése, a sztomatikus és a nem-sztomatikus limitáció értelmezése*

A növények életük során gyakran ki vannak téve a szárazságnak, ami az alacsony talajvíztartalom vagy az atmoszférikus vízhiány következménye. A fotoszintézis valamint a sejtnövekedés azok közé a folyamatok közé tartoznak, amelyek a szárazság által elsődlegesen érintettek (Chaves, 1991). A szárazság hatásai lehetnek közvetlenek, mint például a sztomákon

vagy a mezofillumon keresztüli diffúzió limitációja, amely csökkenti a széndioxid elérhetőségét (Flexas *et al.*, 2004; 2007), vagy a fotoszintetikus metabolizmus módosulása (Lawlor & Cornic, 2002), avagy mint másodlagos hatások jelentkezhettek oxidatív stresszként (Chaves & Oliveira, 2004). Ez utóbbi a többszörös stresszkörülmények alatt javarészt bekövetkezik (Chaves & Oliveira, 2004) és súlyosan befolyásolhatja a fotoszintézist (Ort, 2001).

A gázcsere nyílások záródása figyelhető meg a levelek turgorának csökkenésekor, az atmoszférában a relatív páratartalom csökkenése esetén, vagy a gyökér által termelt kémiai jelemolekulák hatására. Az atmoszférikus széndioxidnak a kloroplasztisz sztrómába, vagyis a fotoszintézis helyére való bejutásának számos limitáló faktora van (sztomatikus és nem-sztomatikus limitáció). A CO<sub>2</sub> először a külső környezetből a levelek sejtközötti járataiba diffundál a sztómákon keresztül, melyek nyitottsága szabályozza a légudvarba jutó CO<sub>2</sub> mennyiségét (Farquhar & Sharkey, 1982; Assmann *et al.*, 1988). A gázcsere nyílások szabályozó szerepét sztomatikus limitációnak nevezzük. A sztomatikus limitáció relatív mértéke a vízdeficit erősségétől függ. Enyhe szárazság alatt a sztómazáródás az első lépés, amelyet szükségszerűen a fotoszintetikus széndioxid asszimiláció csökkenése követ (Chaves, 1991; Cornic & Briantais, 1991). Enyhe stressz esetén az alacsony sztóma vezetőképességnek (g<sub>s</sub>) protektív hatása lehet, elősegítve a vízmegőrzést és növelve ezzel a növény vízhasznosítási képességét. Rendszerint a sztómák válaszüreakciói szorosabb összefüggést mutatnak a talaj nedvességtartalmának mint a levél vízállapotának megváltozásával. Ezek alapján feltételezik, hogy a sztómák reagálnak a dehidratált gyökerek produktumaira (pl. az abszcizinsav), mint kémiai jelemolekulákra (Davies & Zang, 1991). Lawlor (2002) kutatásai szerint a növényi sejtek szénmetabolizmusának megváltozása valószínűleg szintén előfordul a dehidráció korai szakaszában. A szárazságtűrő fajok a sztómaműködésük szabályozása révén bizonyos mértékű szén-asszimilációt képesek fenntartani szárazság alatt, vagy a vízhiány megszűntekor gyorsan nyitják sztómáikat. A vízdeficit korai biokémiai hatásai magukban foglalják a fotofoszforilációban bekövetkező változásokat (az ATP mennyiségének csökkenése a ribulóz 1,5-biszfoszfát (RuBP) regenerációjának csökkenéséhez vezet) (Tezara *et al.*, 1999), amelynek mértéke fajfüggő (Lawlor & Cornic, 2002).

Ahogy a sztómák záródnak, a CO<sub>2</sub> moláris frakciója csökken a levelek kloroplasztiszaiban. Ezáltal a ribulóz 1,5-biszfoszfát karboxiláz oxigenáz (Rubisco) enzim

CO<sub>2</sub> ellátása meggyengül, amelynek következményeként a C<sub>3</sub> típusú növények RuBP oxigenációja emelkedik és a fotoszintetikus elektronok fő fogyasztójává válik. Megfigyelték a fotoszintetikus aktivitás csökkenését magas fényintenzitás és hőmérséklet mellett, és vízhiány hatására az energia disszipáció mértékének fokozódását a fotoszintetikus apparátusban. Az ún. nem-sztomatikus limitáció elemei közé tartozik a mezofillum limitáció. A mezofill konduktancia ( $g_m$ ) (Flexas *et al.*, 2004; 2007) megváltozása kapcsolatban lehet a sejtközi járatok szerkezetének fizikai módosulásával a levél fonnyadásakor (Lawlor & Cornic, 2002), vagy a biokémiai változásokkal (bikarbonát → CO<sub>2</sub> konverzió), és/vagy a membrán permeabilitással (akvaporinok). Genty és munkatársai (1998) kutatásai azonban arra világítottak rá, hogy a CO<sub>2</sub> diffúzióval szembeni internális rezisztencia javarésze a sejteken belüli folyadékfázisban található. Ezt a nézetet támogatják mások is (Flexas *et al.*, 2006; 2008), a  $g_m$  ezek alapján inkább biokémiai szabályozott, semmint egyszerűen a levél anatómiai tulajdonságai által. Vízmegvonásos kísérletekkel demonstrálták, hogy a CO<sub>2</sub> asszimiláció intenzitásának szignifikáns csökkenése a számottevően megnövekedett metabolikus limitációnak, semmint a sztómalimitációnak tudható be (Lawlor, 2002; Flexas *et al.*, 2006). A lecsökkent fotoszintetikus elektron felhasználás egy közvetlen következménye annak, hogy a szárazság az elérhető CO<sub>2</sub> mennyiségének csökkenését idézi elő, ill. növeli egyéb alternatív elektrontranszport utak kialakulásának valószínűségét, úgymint a fotorespiráció és a Mehler-reakció (Cornic & Freseau, 2002). A metabolikus limitáció biofizikai és biokémiai folyamatok következménye, melyek működése C<sub>3</sub> növényekben bizonyos mértékben tisztázott (Lawlor, 2002; Flexas *et al.*, 2006). A Rubisco tartalmának (Tezara *et al.*, 2002) és aktivitásának (Tenhunen *et al.*, 1984) megváltozását; az ATP lecsökkent szintézisét ill. a RuBP regenerációjának csökkenését (Flexas & Medrano, 2002); a klorofill tartalom lecsökkenését ill. az alacsonyabb fotokémiai hatásfokot (Ögren & Öquist, 1985; da Silva & Arrabaça, 2004; Flexas *et al.*, 2006) a metabolikus limitáció elemeinek tekintik.

Tartós stressz körülmények alatt megfigyelhető a Rubisco enzim deaktivációja alacsony intercelluláris CO<sub>2</sub> koncentráció ( $C_i$ ) esetén (Meyer & Genty, 1998). Amikor a szárazság mellett a növényeket egyéb stresszhatások is érik, úgymint magas fényintenzitás és hőmérséklet, valószínűsíthető a fotoinhibíció bekövetkezése is. A CO<sub>2</sub> megkötést limitáló körülmények között a redukáló erők keletkezése gyorsabb, mint azok Calvin ciklus általi

felhasználása. A hosszantartó száraz periódus alatt a levél víztartalma lényegesen visszaesett borsó növényekben, ami a PSII “core” komplexek mennyiségének jelentős csökkenéséhez vezetett. A megmaradó PSII komplexek funkcionálisan működőképesnek bizonyultak, illetve újraszerveződtek. A vizsgálatok alapján a CP43 komplex valamint a D1 protein fokozottan degradálódtak szárazság alatt (Girardi *et al.*, 1996). Mások is alátámasztják ezt a megfigyelést, miszerint a nagyobb PSII fehérjék egyensúlyi szintje, beleértve a D1 és a D2 proteineket, a szárazság előrehaladtával csökken, ami feltehetőleg a megnövekedett degradációnak köszönhető. A vízdeficitnek a PSII proteinek metabolizmusára gyakorolt hatása indokolhatja, különösképpen a RC fehérjék esetében, a PSII fotokémiájának károsodását (He *et al.*, 1995). Továbbá kimutatták, hogy a vízmegvonás hatására nagyobb mértékben emelkedik a PSII- $\beta$  inaktív centrumok mennyisége a szárazságra érzékeny borsó változatokban, mint a szárazságra toleránsokban (Yordanov *et al.*, 1997; Gonzales *et al.*, 2001). A membránlipideknek kulcsfontosságú szerepük van a növényi sejtek szintjén a rezisztencia kialakulásában a különféle környezeti faktorokhoz történő akklimatizáció során (Kuiper, 1980; Suss & Yordanov, 1986). Erős vízhiány esetén zavart szenved a membránlipidek és proteinek közötti asszociáció, valamint enzimaktivitás csökkenés és a membrán kettősréteg transzport kapacitásának csökkenése tapasztalható (Caldwell & Whitman, 1987). A szárazságra érzékeny növényekben számottevően nagyobbak bizonyult a zsírsavbontás stimulációja, mint a szárazságra toleránsabb változatokban (Sahsah *et al.*, 1998). A neutrális lipidek mennyiségének csökkenése a levélben főként a monogalaktozil-diacil-glicerol (MGDG) tartalom csökkenésének köszönhető, és az MGDG/digalaktozil-diacil-glicerol (DGDG) arány ugyancsak lecsökkent (Benhassaine-Kesri *et al.*, 2002).

### 2.2.2. A védekező/szabályozó folyamatok szerepe a vízhiány kivédésében

A növények számos protektív mechanizmust fejlesztettek ki fotoszintetikus apparátusuk védelme érdekében a környezeti faktorok károsító hatásaival szemben. Bohnert és Shen (1999) kutatásai szerint csaknem univerzális válaszreakciónak tekinthető stresszkörülmények alatt, beleértve a szárazságot is, az ozmotikus szabályozás révén különféle kompatibilis ozmotikumok felhalmozása. Az ozmoreguláció a növény számára kedvezőbb vízpotenciál gradiens kialakulását teszi lehetővé, ezáltal hozzájárul a sejt turgorának fenntartásához (Zhang

*et al.*, 1999). Így a vízhiány bizonyos mértékig elkerülhető vagy jelentős mértékben csökkenthető. Ezek a vegyületek főként alkilaminok vagy polihidroxil vegyületek, valamint szacharidok és ezek polihidroxil származékai. A stresszfiziológiában általánosan elfogadott szerepük az ozmoreguláció, ezen kívül más funkcióval is rendelkezhetnek, nevezetesen az enzimek és a membránszerkezet védelmét biztosítják, valamint a reaktív oxigén gyökök eliminálásában is részt vehetnek.

Szárazság alatt a többlet redukáló erő elleni fotoprotektív mechanizmusok igen fontosak. Ezek a fotokémiával versengenek az elnyelt energiáért, amely a PSII hatásfokának csökkenéséhez vezet (Genty *et al.*, 1989). Az egyik legfontosabb fotoprotektív mechanizmus a növényekben, hogy elkerüljék vagy csökkentsék a fotoszintetikus apparátusuk károsodását, a klorofill fluoreszcencia nem-fotokémiai kioltása (Ruban & Horton, 1995), melynek során a gerjesztési többletenergia hőként disszipálódik a PSII antenna komplexében. Golding és Johnson (2003) vizsgálataik során azt a megfigyelést tették, hogy az 'aktív' PSI centrumok aránya megemelkedett a száraz periódus alatt. Feltételezéseik szerint ezek elsődlegesen a ciklikus elektrontranszportban vesznek részt, amely a  $\Delta pH$  fokozásával hozzájárul a nem-fotokémiai kioltás fenntartásához, és megvédi a PSII-t. A regulált termális disszipáció valamiképpen magában foglalja a xantofill ciklust (Demmig-Adams & Adams, 1996) és a lutein ciklust (Matsubara *et al.*, 2001), jóllehet utóbbi szerepe nem teljesen világos még. A levelek alacsony víztartalma mellett a  $CO_2$  asszimiláció és ezáltal az ATP felhasználás csökken, miközben a funkcionális elektrontranszport működése proton akkumulációt eredményez a tilakoid lumenben, ami a Zea és az Ant képződésének kedvez. Úgy vélik, hogy a fotoprotektív folyamat működése által elvezetődik az energia a reakciócentrumokból (Ruban & Horton, 1995). Vannak azonban olyan kísérleti adatok is, amelyek nem támasztják alá azt a megállapítást, miszerint a xantofill ciklus jelentős vagy specifikus szerepet játszik az elnyelt fényenergia közvetlen energia disszipációjában (Schindler & Lichtenthaler, 1994). Tambussi és munkatársai (2002) kutatásai szerint a fluoreszcencia nem-fotokémiai kioltása, valamint a Zea+Ant tartalom a közepes vízhiány következtében szignifikánsan megemelkedett. Jóllehet, az erős szárazság által indukált xantofilok mennyiségének további növekedése nem hozható kapcsolatba a hődisszipáció mértékének emelkedésével. Kimutatták továbbá a  $\beta$ -karotin tartalom erős szárazság által kiváltott szignifikáns emelkedését, amely az antioxidáns védekezés fokozódását jelezheti.

A fotorespiráció szintén részt vehet a fotoszintetikus apparátus védelmében a magas fényintenzitás károsító hatásával szemben, ahogyan ez a jelenség szárazság alatt néhány faj esetében megfigyelhető (Chaves *et al.*, 2003). A fotorespiráció által termelt hidrogénperoxidnak szerepet tulajdonítanak a jelátvitelben és az akklimatizáció folyamataiban, amikor a CO<sub>2</sub> hozzáférése limitált (Noctor *et al.*, 2002). Az antocianinok felhalmozódása, melyek a fotooxidatív károsodást védik ki a sejtekben, különösen fontosak lehetnek öregedő levelekben, melyekből így hatékony tápanyag visszanyerés folyik a növény raktározó kompartmentumaiba (Feild *et al.*, 2001).

### 2.2.3. Stratégiák a vízhiány tolerálására

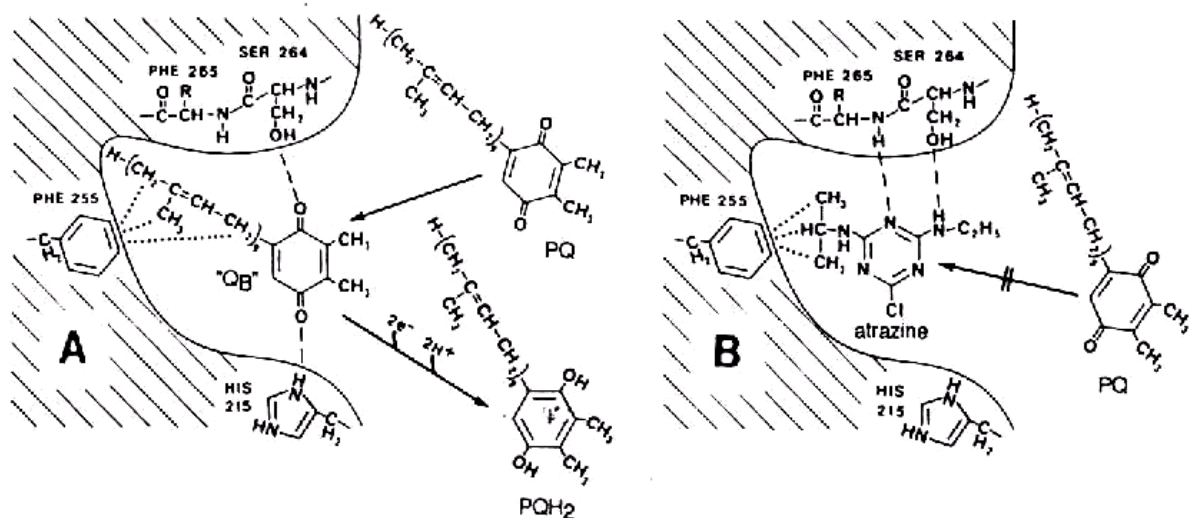
A növény túlélőképessége az egész növényre jellemző mechanizmusoktól függ, melyekkel megfelelően tud reagálni a sejtszintű vízhiányra. A szárazságtűrési stratégiák különbözőek lehetnek. A szárazságot toleráló növények a dehidratáltság ellenére képesek az élettani funkcióik megtartására. Az elkerülő stratégia esetén a növények még a nedves évszakban befejezik az életciklusukat, a száraz periódus előtt. A vízpotenciál csökkenését kivédő növények képesek fenntartani a szövetek hidratáltságát, ezen belül vagy vízmegőrző stratégiát követnek, vagy a vizet továbbra is nagy mennyiségben fogyasztják, de gondoskodnak annak pótlásáról, például mélyebb gyökérzet segítségével. A CAM (Crassulaceae Acid Metabolism) növények adaptációs előnyben vannak, mivel azok nappal zárva tarthatják a sztómáikat, csökkentve ezzel a párolgási veszteséget, és lehetővé téve ezzel túlélésüket erősen vízhiányos, sokszor fűsivatagi, sivatagi körülmények között is.

A zárwatermők egy csoportja, melyeket újraéledő növényeknek nevezünk, képesek a szélsőséges vízvesztést is elviselni (Bernacchia & Furini, 2004); a hosszú száraz periódus alatt nyugalomban maradnak, majd a rehidráció után újraélednek. A dehidráció számos transzkriptum expresszióját indukálja az újraéledő növényekben, ezek közül a védő funkcióval rendelkező géntermékek közül azonosították a LEA (Late Embryogenesis Abundant) fehérjéket, melyek a citoplazmában magas szinten fejeződnek ki a dehidráció és/vagy a vegetatív növényi szövetek abszcizinsav-kezelésének következtében. Általában a cukrok koncentrációjának megemelkedése is megfigyelhető a deszikkáció kezdetekor ezekben a

növényekben, ezek hatásosak lehetnek az ozmotikus szabályozásban, vagy a membránstruktúrát és a fehérjét stabilizálhatják.

### 2.3. Az atrazin rezisztencia

A herbicid-rezisztens gyomnövények felbukkanása főként a művelés alatt álló területekhez kapcsolódik. A triazin-típusú gyomirtószeresek reguláris és intenzív használata a különböző gyomnövények esetében rezisztens biotípusok felszaporodását eredményezte. A D1 fehérje, ami a PSII RC alkotója, nem csupán a PQ redukciójának a színtere, hanem herbicidek kötőhelyeit is tartalmazza. A PSII-t gátló herbicidek specifikusan és hatékonyan blokkolják a PQ redukcióját azáltal, hogy kompetitíven kiszorítják a  $Q_B$  kinon formáját a kötőhelyéről (Velthuys, 1981; Arntzen *et al.*, 1982; Vermaas *et al.*, 1983). A  $Q_B$  kiszorítása után az inhibitorok szerkezetüktől függően elfoglalják a  $Q_B$  kötőhelyének különböző, de átfedő részeit, meggátolva a  $Q_A$  felőli elektronáramot a PQ készlet irányába. A gyomnövényekben előforduló 2-kloro-4-(etilamino)-6-(izopropilamino)-triazin (atrazin) rezisztencia a PSII RC 32 kDa móltömegű, D1 fehérjét kódoló, *psbA* kloroplasztisban lokalizált gén pontmutációjának tulajdonítható (Hirschberg *et al.*, 1984; Gressel, 1985), melynek következtében a D1 protein láncának 264-es pozíciójában szerin helyett glicin ( $\text{Ser}_{264} \rightarrow \text{Gly}$ ) jelenik meg (Hirschberg & McInthosh, 1983; Hirschberg *et al.*, 1984). Ez nemcsak az atrazinnak a  $Q_B$  kötőhelyhez való affinitását csökkenti drasztikusan, ami a rezisztencia okának tekinthető, hanem a  $Q_B$  kötődését is módosítja (Pfister & Arntzen, 1979). Ezáltal lelassul a  $Q_A$  és  $Q_B$  közötti elektronátadás sebessége, ugyanis a kötődési affinitás erősen függ a D1 protein szerinjének hidroxil csoportja és a  $Q_B$  karbonil csoportja (4. A ábra), és az atrazin aminoetilén csoportja közötti hidrogénhidas kötéstől (4. B ábra) (Arntzen *et al.*, 1979; Pfister & Arntzen, 1979; Trebst, 1991). Az atrazin rezisztenciát kísérő számos, ún. pleiotróp hatás között a lassúbb PSII elektrontranszport sebességet, a PSII-höz kötődő fotokémiai folyamat kisebb hatékonyságát és az AR növények gyengébb produktivitását is általánosan megfigyelték (Holt *et al.*, 1981; Ort *et al.*, 1983; Ireland *et al.*, 1988). Számos szerző úgy tartja, hogy a tilakoid membránok lipid és zsírsav összetételében észlelhető különbségek okozhatják az AR biotípusok magas hőmérsékletekkel szembeni kisebb toleranciáját (Ducruet & Lemoine, 1985; Havaux, 1989), amely magyarázhatja a gyengébb produktivitást is.



**4. ábra** A  $Q_B$  (A) és az atrazin (B) kölcsönhatásának sematikus ábrázolása a D1 fehérje  $Q_B$  kötőhelyén (Fuerst & Norman, 1991). A hidrogénhid kötések szaggatott, a hidrofób kölcsönhatást pontozott vonalak jelölik. Az atrazin bekötődése korlátozza a PQ kötődését. A mutáció (Ser<sub>264</sub>→Gly) révén az alacsonyabb fokú hidrogénhid kötés gyengíti az atrazin (és a PQ) kötődési tulajdonságait.

Nevezetesen, az AR növény kloroplasztiszai több MGDG-t, viszont kevesebb DGDG-t és foszfatidil-gliceridet tartalmaznak az AS növényhez képest. A kloroplasztiszok összes lipidje az AR biotípus esetében nagyobb mérvű telítetlenséget mutat, amely a glikolipid frakció nagyobb linolénsav és kisebb palmitinsav tartalmának köszönhető. A foszfolipidek zsírsav összetétele a foszfatidil-glicerid kivételével nem különbözött. Az AR növények tilakoid membránjainak lipid mátrixa a fluoreszcencia polarizációs mérések tanúsága szerint nagyobb fluiditást mutat az AS növényekéhez viszonyítva (Lehoczki *et al.*, 1985). Az AR biotípusok nagyobb fényérzékenységről és a fénygátlással szembeni nagyobb érzékenységről egyaránt beszámoltak (Holt *et al.*, 1981; Hart & Stemler, 1990; Curwiel *et al.*, 1993; Sundby *et al.*, 1993a; Váradi *et al.*, 1994; Darkó *et al.*, 1996; 2000).

A sötétadaptált triazin-rezisztens biotípusú növények levelei nagyobb mennyiségben tartalmaznak redukált  $Q_A$ -t, mint a vad típusé (Pfister & Arntzen, 1979), ami limitálhatja a töltésszétválasztások számát, csökkentve ezáltal a PSII hatásfokát. Fluoreszcencia kioltás analízis vizsgálatok szintén alátámasztották a  $Q_A^-$  magasabb "steady-state" koncentrációjának

meglétét (Curwiel *et al.*, 1993; Sundby *et al.*, 1993b; Darkó *et al.*, 1995; 1996). Ez feltételezhetően a mutációval összefüggő lassabb  $Q_A^-$  reoxidáció következménye lehet (Várad *et al.*, 1994). A Chla indukciós görbe kezdeti szakaszában a triazin-rezisztens növényekben legtöbbször magasabb  $F_i$  szintet mértek (Arntzen *et al.*, 1979; Pfister & Arntzen, 1979; Ducruet & Lemoine, 1985; Gressel, 1985; Schönfeld *et al.*, 1987), ami a  $Q_A$  prompt fotoredukciójának sebességét mutatja (Melis, 1985). A Várad és munkatársai (2003) által vizsgált valamennyi AR növény egyértelműen csökkent fotokémiai hatásfokkal (qP) rendelkezett valamennyi fényintenzitáson.

Schönfeld *et al.*, (1987) ATP szintézis vizsgálatai nem mutattak eltérést *Phalaris paradoxa* növények vad és mutáns biotípusai között, nem tapasztaltak változást a tilakoid membránon keresztüli protongradiens kiépülésében, ekképpen a foszforiláció folyamata nem különbözött a két biotípusban. Vitatható azonban az a tény, hogy a mutáns növényekben a  $Q_A$ - $Q_B$  között megfigyelhető 3-10-szer lassabb elektrontranszfer vajon hogyan korlátozhatja a teljes fotoszintetikus elektrontranszportláncot állandósult körülmények között megvilágítás után, vagy vajon a mutáció hatása csupán közvetetten jelentkezik az alacsonyabb fotoszintetikus aktivitásban (Ort *et al.*, 1983; Ireland *et al.*, 1988). A válasz nem nyilvánvaló, mivel a fotoszintetikus elektrontranszport limitáló lépése fiziológiai körülmények között általában a PQ készlet Cyt *b<sub>6</sub>/f* komplex általi oxidációja (Genty & Harbinson, 1996). Alacsony fényintenzitásokon az AR típusok  $CO_2$  fixáció sebessége alacsonyabb, mint a vad típusé. A fényintenzitás emelkedésével ez a különbség csökken, és telítési fényintenzitásokon a kétféle biotípus értékei hasonlóak (Holt *et al.*, 1981; Ort *et al.*, 1983; Várad *et al.*, 2003), néhány esetben az AR mutáns felül is múlja a vad típust (Schönfeld *et al.*, 1987).

Először Várad és munkatársai (1994) bizonyították, hogy a *Conyza canadensis* AR biotípusában alacsonyabb a xantofill ciklus aktivitása. Kimutatták továbbá, hogy az AR biotípusokban nagyobb sebességgel működik a D1 protein degradációs/helyreállítási folyamata (turn over) (Sundby *et al.*, 1993a; Darkó *et al.*, 2000). Elképzelhetőnek tartják, hogy a magasabb fényérzékenység a megemelkedett D1 protein turn over-nek (Sundby *et al.*, 1993a) és/vagy *in vivo* a xantofill ciklus alacsonyabb aktivitásának (Várad *et al.*, 1994; Darkó *et al.*, 1995) köszönhető. Továbbá az NPQ alacsonyabb mértékét detektálták AR növényekben magas fényintenzitás mellett (Szigeti & Lehocski, 2003). Nem találtak szignifikáns és egyértelmű különbségeket a xantofill ciklus készlet méretében a kétféle biotípus között

(Váradi *et al.*, 2003). E feltételezés szerint az alacsonyabb qE (az NPQ energiafüggő frakciója) és az alacsonyabb mennyiségű Zea létrejöttéért felelőssé tehető egyik mechanizmus talán az alacsonyabb sebességű fotoszintetikus elektrontranszport, amely a tilakoid membránon keresztüli kisebb  $\Delta pH$  létrejöttét eredményezheti, mely alacsonyabb Vio de-epoxidációt von maga után. Darkó és munkatársai (2000) kimutatták, hogy a Vio de-epoxidáz enzim kapacitása a *Conyza canadensis* kétféle biotípusából izolált tilakoidokban azonos.

Számos gyomfaj AR biotípusa árnyékos nevelési környezetnek megfelelő levélanatómiai jelleget és kloroplasztisz ultrastruktúrát mutat, beleértve a nagyobb mértékű gránumosodást. A mutáció következtében a fotoszintetikus apparátus szerkezete is változik: a csökkent Chl *a/b* arányt és a fénybegyűjtő Chl-fehérje komplexek nagyobb mennyiségét írták le D1 fehérje mutáns növényekben (Burke *et al.*, 1982; Holt & Goffner, 1985; Lemoine *et al.*, 1986). A Váradi és munkatársai (2003) által tanulmányozott valamennyi faj AR biotípusa következetesen alacsonyabb Chl *a/b* aránnyal bírt a vad, atrazin-szenzitív (AS) típusokhoz képest. Ez jelezheti a PSII/PSI arány eltolódását és/vagy egy relatíve magasabb LHC antenna méretet, ez utóbbi pedig eredményezheti egy nagyobb mennyiségű többlet gerjesztési energia kialakulását a fotoszintetikus apparátusban (Váradi *et al.*, 2003). Ez az árnyéklevél tulajdonság (Fedtke, 1979) a gyenge xantofill ciklus aktivitással együtt jól magyarázhatja néhány faj AR biotípusában a magas fényérzékenységet és a magas gerjesztési nyomást, különösen alacsony fényintenzitásokon (Váradi *et al.*, 2003).

Habár az atrazin rezisztencia molekuláris bázisa az eddigi kutatások szerint a D1 protein egyetlen pontmutációján lokalizálódik, felmerül a kérdés, miként gyakorolhat ez ilyen összetett hatást a teljes növény szintjén. Miután a D1 protein egy kloroplasztiszban kódolt fehérje, az atrazin rezisztencia anyai úton öröklődik (Souza Machado *et al.*, 1978). Ugyanazon az élőhelyen gyűjtött AR és AS növények is különbözhetnek egyes sejtmagban kódolt olyan tulajdonságokban, amelyek bizonyos fokig kompenzálhatják az atrazin rezisztenciát kísérő negatív fiziológiai következményeket (McCloskey & Holt, 1990). Izonukleáris biotípusokkal – amelyek kizárólag az atrazin rezisztencia tulajdonságában különböznek – végzett kutatások eredményei azonban igazolták, hogy a megváltozott kloroplasztisz működés az AR biotípusban az egész növény szintjén korlátozza a fotoszintézist, a növekedést és a produktivitást (McCloskey & Holt, 1990; Beversdorf *et al.*, 1988; Darmency & Pernes, 1989; Gressel & Ben-Sinai, 1985; Stowe & Holt, 1988; van Oorschot & Leeuwen, 1989).

### 3. CÉLKITŰZÉS

A többlet gerjesztési energia fényindukált termális disszipációja fontos szerepet játszik a PSII antennarendszerében megvalósuló energia-áramlás szabályozásában. A termális disszipáció kapacitását a klorofill fluoreszcencia nem-fotokémiai kioltásaként (NPQ) határoztuk meg. Ismeretes, hogy az S264G D1 protein mutáns AR gyomnövények alacsonyabb NPQ és qE kapacitással rendelkeznek, mint vad-típusú AS párjaik (Váradi *et al.*, 2003). Az NPQ kialakulásában ez idáig azonosított tényezők sejtmagi gének szabályozása alatt állnak. Nem világos, hogy a PSII reakció centrum D1 fehérjéje, amelyet a kloroplasztisz genomban a *psbA* gén kódol, milyen hatással van az antennában végbemenő hődisszipáció kialakulására. Ezért munkám során célul tűztam ki a következőket:

- Milyen kapcsolat van a D1 protein mutáció és a PSII antennájában elnyelt fényenergia allokációja között: a fotokémiai hasznosítás és a termális disszipáció?
- A klorofill *a* fluoreszcencia analízis és a fotoprotektív folyamatok vizsgálata segítségével az alacsonyabb NPQ, illetve a qE komponens értelmezése a D1 protein mutáns növényekben.
- Ennek megválaszolására reciprok keresztezésekkel hibridek létrehozása, melyeken tanulmányozható a PSII allokációs mintázata, a qE és a gyors Chl fluoreszcencia paraméterek öröklődése; sejtmagi és citoplazmatikus (kloroplasztisz) faktorok szerepe a qE szabályozásában.

Ismeretes az atrazin-rezisztens növények eltérő hőmérséklet-érzékenysége és adaptációs képessége (Ducruet & Lemoine, 1985), illetve fokozott fényérzékenységről egyaránt beszámoltak (Hart & Stemler, 1990). Tudomásunk szerint a vízdeficit (szárazság) fotoszintézisre gyakorolt hatásait ez idáig nem vizsgálták még D1 protein mutáns növényekben. Kíváncsiak voltunk, vajon a vízdeficit befolyásolja-e a mutáns növények fitneszt. E kérdéskörben az alábbi célokat tűztam ki:

- A progresszív vízmegvonás hatásának megfigyelése intakt növények leveleinek vízállapotára, gázcseréjére és fotoszintetikus hatékonyságára.

## 4. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 4.1. A vizsgált növényi anyag

A kísérleti növényeim természetes körülmények között természetes módon szelektálódott vad-típusú, AS és D1 protein mutáns, AR *Solanum nigrum* L. (fekete csucsor) gyomnövények voltak. Az atrazin rezisztencia oka az általunk vizsgált gyomnövényben a *psbA* gén pontmutációja a 264-ik kodonban, amely a Ser<sub>264</sub>→Gly aminosavcserét eredményezi a D1 fehérjén. (Hirschberg & McIntosh, 1983; Gawronski *et al.*, 1992). A laboratóriumunkban elérhető különböző D1 protein mutáns gyomnövények (*Chenopodium album* L. (fehér libatop), *Conyza canadensis* L. (betyárkóró), *Epilobium adenocaulon* L. (jövevény füzike), *Senecio vulgaris* L. (közönséges aggófű) és *Solanum nigrum* L. (fekete csucsor)) közül azért esett a választásunk a fekete csucsorra, mert sikeresen nevelhető laboratóriumi körülmények között, viszonylag rövid az életciklusa, jól kezelhető levelei vannak a gázcseremérések szempontjából, valamint szülő vonalakból (AS és AR) hagyományos keresztezési eljárással laboratóriumi körülmények között sikeresen produkáltunk hibrideket.

Összehasonlító tanulmányokat végeztem továbbá két, csökkent NPQ-val rendelkező *Arabidopsis thaliana* L. (*A. thaliana*) mutáns vonal felhasználásával. Vad típusként a Columbia-0 ökotípust (Col-0) használtam. A két mutáns vonal az antiszensz *lhcb2* és a *psbS* deléciós *npq4-1* voltak. Míg az előbbiben a kettes fénybegyűjtő pigment-fehérje komplexek (LHCII) fő alkotó elemei, az Lhcb1 és Lhcb2 fehérjék majdnem teljesen hiányoznak az *Lhcb2* antiszensz konstrukció kifejeződése miatt (Ganeteg *et al.*, 2001; Andersson *et al.*, 2003; Ruban *et al.*, 2003), az utóbbiban a *psbS* gén deléciója következtében a PsbS fehérje teljesen hiányzik (Li *et al.*, 2000; 2002b).

### 4.2. Növénynevelés, vízmegvonás

A *S. nigrum* növények nevelésénél a magokat először petricsészébe helyeztük, amelyben nedves szűrőpapíron, sötétben egy héten át csíráztak szobahőmérsékleten. A kicsírázott magokat kertészeti földbe helyeztük, majd a kikelt növényeket tenyészedényekbe ültettük át. A növényeket növénynevelő kamrákban neveltük, ahol a maximális fotoszintetikusan aktív

radiáció értéke  $350 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  volt (16 h fényperiódus, 25/20°C nappali/éjszakai hőmérséklet, kb. 50-60%-os relatív páratartalom mellett). A növényeket kétnaponta öntöztük a kísérletek alatt, a 35-40 napos növényeket tekintettük jó vízellátású kontrollnak. A vetés utáni kb. 40-42. napon a növények egy részétől megvontuk az öntözést, és gázcsereméréseket végeztünk három-négy naponta, hogy a vízdeficit hatásait tanulmányozzuk. A növények vízállapotát és gázcseréjét jellemző paraméterek alapján három szakaszt különítettünk el a vízdeficit időbeni vizsgálata során: enyhe szárazság (5-7 nap vízmegvonást követően), közepes szárazság (13-15 nap), és erős szárazság (18-19 nap), melyeket DH1 (dehydration state 1), DH2 (dehydration state 2), és DH3 (dehydration state 3) jelöléssel illettük. A vízhiány egyes szakaszaiban a növények egy részét a rehidráció után 24 órával tovább vizsgáltuk, és RH1, RH2 vagy RH3 (rehydration state 1, 2 és 3) jelöléssel illettük. A vízhiány periódusa alatt gázcsereméréseket a DH2 állapotig folytattunk, mivel a sztómazáródás következtében a DH3 szakaszban már a  $\text{CO}_2$  asszimilációs ráta értéke alacsonyabb volt, mint  $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Méréseinket rendre a növények legfiatalabb, teljesen kiterült, azonos pozícióban lévő levelein végeztük.

Az *A. thaliana* növények magvait kertészeti földet tartalmazó tenyészedenyekbe helyeztük, növénynevelő kamrákban csíráztattuk és neveltük, ahol a maximális fotoszintetikusan aktív radiáció értéke  $350 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  volt (16 h fényperiódus, 25/20°C nappali/éjszakai hőmérséklet, kb. 50-60%-os relatív páratartalom mellett). Méréseinket rendre a kb. hat hetes növények legfiatalabb, teljesen kiterült levelein végeztük.

#### 4.3. Reciprok keresztezések kivitelezése, genetikai analízis

Az AS és AR *S. nigrum* szülő biotípusok reciprok keresztezésével F1 hibrideket hoztunk létre. A levélszél típusát figyelmen kívül hagyva, véletlenszerűen kiválasztottunk 15 darab AS és 15 darab AR biotípusú növényt, melyek a női (♀) szülőpopulációul szolgáltak. Hasonlóképpen, 15 darab AR és 15 darab AS növényegységet választottunk hím (♂) szülőpopulációul a reciprok keresztezésekhez. A 15-15 AS és AR anyaként szolgáló növényeken a bimbós állapotban lévő virágok éretlen portokjait eltávolítottuk, mielőtt az önmegporzás végbement volna, majd a vad-típusú AS (♂) pollent az AR (♀) növények bibéjére transzferáltuk, és az AR (♂) növények pollenjét a vad-típusú, AS (♀) növények bibéjére vittük át. A megporzást a

növénynevelő kamrákban végeztük, ezzel kizárva a rovar általi megporzás lehetőségét. A sikeres megtermékenyítés aránya kb. 50%-os volt; átlagosan 20 virág/növényt poroztunk meg, és ebből kb. tíz darab virág termékenyült meg, majd hozott magot, kb. 20-25 mag/termés hozammal. Az első reciprok keresztezésből származó F1 hibrideket ARF1 és ASF1-nek definiáltuk. Miután e heterozigóta F1 növényekben megtörtént az önbeporzás (a *S. nigrum* önbeporzó), létrejöttek az F2 nemzedékű magok, melyeket ASF2 és ARF2-nek neveztünk. Az F2 növényeket használtuk a levélszél alak vizsgálathoz annak bizonyítására, hogy a mendeli levélszél tulajdonság szegregációja megtörtént-e. A szülő populációban három különböző levélszél típust találtunk, melyek Hardy-Weinberg eloszlást mutattak. A különböző levélszél típusok várható gyakoriságát a Hardy-Weinberg szabály alapján számoltuk ki. További keresztezéseket folytattunk, melyekben épszélű ASF2 (♀) és csipkézett AR (♂) szülőt vagy csipkézett ARF2 (♀) és épszélű AS (♂) szülőt használtunk, hogy létrehozzuk az F3 utódnövényeket (ASF3 és ARF3). Hasonlóan, épszélű ASF3 (♀) és csipkézett AR (♂) szülőt vagy csipkézett ARF3 (♀) és épszélű AS (♂) szülőt kereszteztünk, mellyel létrehoztuk az F4 hibrideket (ASF4 és ARF4), és így tovább az F6 nemzedékig. A *S. nigrum* szülő és hibrid vonalakban az S264G mutáció meglétét a *psbA* gén részleges megszekvenálásával bizonyítottuk. Valamennyi *S. nigrum* vonal esetében a csíranövényeket közvetlenül 8 kg aktív hatóanyag/hektár atrazinnal permeteztük, illetve felhasználva a mutáció jól ismert manifesztálódásait, vizsgáltuk a növények gyors Chl<sub>a</sub> fluoreszcencia indukciós görbéit. Az F2 növényi anyag sejtmagi hibrid státuszát a teljesen kifejlődött levelek morfológiájának vizsgálatával igazoltuk.

#### **4.4. A növény vízellátásának vizsgálata**

##### *4.4.1. Sztómasűrűség vizsgálata*

A gázcsere nyílások számát a levelek abaxiális felületéről készült lenyomatok felhasználásával határoztuk meg 1 mm<sup>2</sup>-es felületen egy digitális CCD kamerával felszerelt reflexiós és fluoreszcencia mikroszkóp segítségével, amely egy komputerhez csatlakozott. A számolást a Computer Assisted Microscope Methods with Image-Pro Plus 3.0 Software segítségével végeztük el. Az átlagos sztómaszámot 116 növényről származó 116 levél vizsgálatával kaptuk

meg biotípusonként, egy levélen belül hatszoros ismétléssel A növények három független növénynevelésből származtak.

#### *4.4.2. A levelek relatív víztartalmának meghatározása*

A kontroll körülmények és a vízhiány szakaszainak jellemzésére meghatároztuk a levelek relatív víztartalmát (RWC) a következő képlet felhasználásával:  $(FW - DW)/FW_s$ , ahol az FW a levelek friss tömege, a DW a levelek száraz tömege 24 órán át 85°C-on szárítószekrényben való szárítást követően, valamint az  $FW_s$  a 24 órán keresztül vízben úsztatott levelek friss tömege grammban [g] kifejezve.

#### *4.4.3. A levélszövetek átlagos vízpotenciáljának mérése*

A levélszövetek átlagos vízpotenciálját nyomásmérő kamrával (Model 600, PMS Instruments Company, USA) határoztuk meg. Az eljárás során a frissen levágott levelet egy légmentesen záródó kamrába helyeztük úgy, hogy abból csak a vágott felület nyúlt ki. A kamrán belül lassan emeltük a nyomást (nitrogén felhasználásával) mindaddig, míg a kinyúló vágott felületen a növény szállítóelemeiből kipréselődő nedvesség csepp formájában meg nem jelent. Az ennek eléréséhez szükséges nyomást a kamrához kapcsolt nyomásmérőről olvastuk le.

#### *4.4.4. Sztóma konduktancia mérése*

A levelek abaxiális felületén a gázcserenyílások vezetőképességét a DELTA T műszergyártó cég (UK) AP4 típusú diffúziós porométerével határoztuk meg a növénynevelő kamrákban, ahol a körülmények a Növénynevelés, vízmegvonás fejezetben leírtak szerint alakultak. A sztómakonduktanciát az  $A/C_i$  görbék felvételekor szintén mértük az LCPro+ infravörös gázelemző készülékkel (IRGA; ADC, UK) (lásd: Gázcseremérések fejezet).

## 4.5. Elektron mikroszkópia

A kloroplasztisz tilakoid struktúrájának vizsgálata transzmissziós elektron mikroszkópiával történt. A növények leveleiből kis darabokat vágunk ki, melyeket 1% glutáraldehidben fixáltunk két órán át. A minták foszfát pufferes (0,1 M, pH 7,2) mosását követően 2%-os osmium tetroxidban egy órán át utófixáltuk őket. Ezután dehidratáltuk a levéldarabokat etanol gradiens sorozatain keresztül, majd propilénoxid mosás után, araldit gyantába ágyasztuk őket. Egy Leica UCT ultramicrotome segítségével vékony szekciókat vágunk, melyeket uranil acetáttal és ólom citráttal festettünk meg. Az így kapott preparátumainkat egy Opton 902 elektron mikroszkóp segítségével tanulmányoztuk.

A levelek abaxiális felületének levélszőreit scanning elektron mikroszkópiával tanulmányoztuk. A vizsgálandó levéldarabok víztelenítése céljából, azokat többlépcsős etanol-, majd aceton gradiens sorozaton vittük át, lépcsőnként 30-30 percig tartva a mintákat az oldatban. Végül a mintákat kritikus pont szárítóban háromszor átmostuk széndioxiddal. A víztelenített mintákat mintatartóra rögzítettük, majd aranyréteget vontunk a felületükre. Az előkészített minta felületéről scanning elektron mikroszkóppal 60-szoros nagyítású fotókat készítettünk.

## 4.6. Gázcseremérések

### 4.6.1. *CO<sub>2</sub> asszimilációs ráta meghatározása a fényintenzitás függvényében*

Az asszimilációs ráta (A) aktinikus fényre adott válaszgörbéit LCA-3 típusú infravörös gázelemző készülékkel (ADC, UK) vettük fel. A gázáramlás sebessége 300 ml perc<sup>-1</sup> volt, rotaméterrel szabályozott. A leveleket tíz percig sötétadaptáltuk a levélkamrában a mérések előtt, majd a fotoszintézist aktiváló fehér fény intenzitását 30-1250  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  között változtattuk, a leveleket hőszűrőn (Melles Griot, USA) keresztül diavetítővel (150 W/24 V halogén izzó) világítottuk meg. Tíz perces megvilágítás valamennyi fényintenzitáson elegendő volt a szén-dioxid asszimiláció egyensúlyi értékének eléréséhez. A referencia levegő széndioxid tartalmát 360  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ -ra állítottuk be, és a levegő oxigéntartalma 21%

vagy 1% v/v volt. Az asszimilációs ráta értékeit a műszer szofvere számította ki von Caemmerer és Farquhar (1981) egyenletei alapján.

#### *4.6.2. CO<sub>2</sub> asszimilációs ráta meghatározása az intercelluláris CO<sub>2</sub> koncentráció függvényében*

Az asszimilációs rátának az intercelluláris CO<sub>2</sub> koncentrációtól ( $C_i$ ) való függését a környezeti CO<sub>2</sub> koncentráció ( $C_a$ ) 0 és 1500  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  intervallum közötti változtatásával 21% O<sub>2</sub> tartalmú levegőben határoztuk meg LCpro+ IRGA készülékkel. A levél felületére beeső fotonáram-sűrűséget 800  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ -ra állítottuk be. Először 360  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  koncentráción akklimatizáltuk a megvilágított levelet tíz percen keresztül. Ezt követően az asszimiláció sebességét valamennyi CO<sub>2</sub> koncentráción tíz perces inkubáció után határoztuk meg. Az adatokat ezután grafikusán ábráztuk a szoftver által számított intercelluláris CO<sub>2</sub> koncentráció függvényében (Farquhar *et al.*, 1990), és lineáris regresszióval meghatároztuk a görbék kezdeti meredekségét 0-200  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  intervallumban, amely érték arányos a Rubisco enzim aktivitásával és/vagy extrahálható mennyiségével. Az  $A/C_i$  görbék további analízise során figyelembe vettük a CO<sub>2</sub> asszimiláció telítési értékét ( $J_{\max}$ ), amely tükrözi a RuBP regenerációjának maximális sebességét.

### **4.7. Klorofill fluoreszcencia mérések**

#### *4.7.1. Gyors klorofill a fluoreszcencia indukció (OJIP görbe) mérése*

A gyors klorofill fluoreszcencia tranziens (OJIP görbe) méréseket a HandyPEA (Plant Efficiency Analyser) fotoszintetikus hatékonyságmérő készülékkel (Hansatech Instruments, UK) végeztük. A 30 percen át sötétadaptált leveleket folyamatos fénnnyel ( $\lambda = 650 \text{ nm}$ , 3000  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  fotonáram-sűrűség) 1 s-ig világítottuk meg. A fényforrást egy három fénykibocsátó diódából (LED) álló rendszer alkotta. A fluoreszcenciát 700 nm-nél nagyobb hullámhosszakon detektáltuk nagy időfelbontásban és különböző adatgyűjtési sebesség mellett (10  $\mu\text{s}$ -tól 1 s-ig). Az OJIP tranziensek további analízisét az ún. JIP-teszttel (Strasser *et al.*, 2000; Tsimilli-Michael & Strasser, 2008), illetve a Biolyzer 4HP szoftverrel végeztük. Az 1.

táblázat tartalmazza a dolgozatomban fellelhető alap és származtatott fluoreszcencia paramétereket, a speciális energia fluxusok, hatásfokok, valamint az ún. fotoszintetikus teljesítmény indexek képleteit és ezek leírásait.

**1. táblázat** Az OJIP klorofill a fluorszcencia tranziens analízise (paraméterek, képletek)

**Fluoreszcencia paraméterek**

$F_t$	Fluoreszcencia intenzitás t időpontban aktinikus megvilágítás mellett
$F_o = F_{20\mu s}$	Sötétadaptált minta alapfluoreszcencia intenzitása t = 20 $\mu s$ időpillanatban (valamennyi PSII RC nyitott)
$F_m = F_p$	Sötétadaptált minta maximális fluoreszcencia intenzitása (valamennyi PSII RC zárt)
$F_v = F_m - F_o$	Maximális változó fluoreszcencia
$F_J = F_{2ms}$	Fluoreszcencia intenzitása a J inflexiónál (t = 2 ms)
$F_I = F_{30ms}$	Fluoreszcencia intenzitása az I inflexiónál (t = 30 ms)

**Származtatott fluoreszcencia paraméterek**

$V_J = (F_{2ms} - F_o)/(F_m - F_o)$	Relatív változó fluoreszcencia a J inflexiónál, mely tükrözi mind a $Q_A^-$ akkumulációjának, mind re-oxidációjának sebességét
$V_I = (F_{30ms} - F_o)/(F_m - F_o)$	Relatív változó fluoreszcencia az I inflexiónál, mely a plasztokinol ( $PQH_2$ ) re-oxidációjának sebességét tükrözi
$M_o = 3,571 \times (F_{300\mu s} - F_o)/(F_m - F_o)$	Fluoreszcencia tranziens $V = f(t)$ approximatív kezdeti meredeksége ( $ms^{-1}$ ), a RC-k záródásának nettó sebessége; (3,571 szorzót használtunk, mivel az $F_o$ szintet t = 20 $\mu s$ -nál határoztuk meg 50 $\mu s$ helyett)

**Specifikus energia fluxusok (\* $Q_A$ -redukáló) PSII reakciócentrumok arányában kifejezve**

$ABS/RC = M_o \times (1/V_J) \times (1/(F_v/F_m))$	Abszorpció fluxus per RC
$TR_o/RC = M_o \times (1/V_J)$	Befogott energia fluxus ( $Q_A$ redukcióhoz vezető) per RC
$ET_o/RC = M_o \times (1/V_J) \times (1 - V_J)$	Elektrontranszport fluxusa (a $Q_A^-$ -on túlra definiált) per RC
$DI_o/RC = (ABS/RC) - (TR_o/RC)$	Disszipált energia fluxusa per RC
$RE_o/RC = (RE_o/ET_o) \times (ET_o/RC)$	PSI végső elektron akceptor redukációjának fluxusa per RC

\* $Q_A$ -redukáló, fotokémiaiilag aktív PSII RC-kat megkülönböztetik stressz hatására konformáció változáson átment,  $Q_A$ -nem-redukáló, fotokémiaiilag nem aktív PSII RC-tól (lásd: Strasser *et al.*, 2004).

### 1. táblázat (folytatás)

#### Hatásfokok és fluxus arányok

$\phi_{P_0} = TR_0/ABS = 1 - (F_0/F_m) = F_v/F_m$	PSII primér fotokémiájának maximális hatásfoka
$\phi_{E_0} = \phi_{P_0} \times \psi_{E_0} = ET_0/ABS = 1 - (F_J/F_m) = \phi_{P_0} \times (1 - V_J)$	Elektrontranszport hatásfoka a köztes elektron hordozók irányában (azaz egy elnyelt foton milyen hatásfokkal eredményez elektrontranszportot a $Q_A^-$ -n túl)
$\phi_{R_0} = \phi_{P_0} \times \psi_{E_0} \times \delta_{R_0} = RE_0/ABS = 1 - (F_I/F_m) = \phi_{P_0} \times (1 - V_I)$	A PSI végső elektron akceptorok redukciójának hatásfoka az elnyelt fotonok arányában
$\phi_{D_0} = 1 - \phi_{P_0} = DI_0/ABS = F_0/F_m$	Energia disszipáció hatásfoka
$\psi_{E_0} = ET_0/TR_0 = (F_m - F_J)/(F_m - F_0) = 1 - V_J$	Annak a valószínűsége, hogy egy RC által befogott exciton egy elektront az elektrontranszportláncba juttat a $Q_A^-$ -n túl
$\psi_{R_0} = RE_0/TR_0 = \psi_{E_0} \times \delta_{R_0} = 1 - V_I$	Annak a valószínűsége, hogy egy RC által befogott exciton egy elektront az elektrontranszportláncba juttat a $Q_A^-$ felől a PSI végső elektron akceptorokhoz
$\delta_{R_0} = RE_0/ET_0 = (F_m - F_I)/(F_m - F_J) = (1 - V_I)/(1 - V_J)$	Annak a valószínűsége, hogy egy elektron a köztes elektron akceptorok felől a PSI végső elektron akceptorokhoz jut

#### Fotoszintetikus teljesítmény indexek

$PI_{abs} = (RC/ABS) \times (\phi_{P_0}/(1 - \phi_{P_0})) \times (\psi_{E_0}/(1 - \psi_{E_0}))$	A PSII által elnyelt fotonoktól a köztes elektron akceptorok redukciójáig tartó energia konverziót jellemző fotoszintetikus teljesítmény index (Performance Index, PI)
$PI_{total} = PI_{abs} \times (\delta_{R_0}/(1 - \delta_{R_0}))$	A PSII által elnyelt fotonoktól a PSI végső elektron akceptorokig tartó energia konverziót jellemző teljes fotoszintetikus teljesítmény index

#### 4.7.2. Modulációs klorofill a fluoreszcencia mérés, fotoprotektív folyamatok vizsgálata

A Chl fluoreszcencia paraméterek steady-state szintjét 60 percig sötétadaptált leveleken a Dual Channel Modulated Fluorometer-rel (FMS2, Hansatech, UK) mértük; a van Kooten és Snel (1990) szerinti nomenklatúrát használtuk. A fluoreszcencia alapszintjét ( $F_0$ ) a

sötétadaptált leveleken egy gyenge ( $\lambda = 583 \text{ nm}$ ) 4,8 kHz-en modulált fénnel gerjesztettük. A levelek maximális fluoreszcenciáját ( $F_m$  a sötétadaptált és  $F'_m$  a fényadaptált levélben, utóbbinál  $1600 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  aktinikus fénnel 15 percen át világítottuk a levelet) 1 s időtartamú, fehér, telítési fényimpulzussal ( $4300 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) indukáltuk (Hansatech PLS1 halogén lámpa). A PSII fotokémiájának optimális hatásfokát az  $F_v/F_m$  formulával jellemeztük, ahol  $F_v = F_m - F_o$ . A Stern-Volmer nem-fotokémiai kioltási paramétert az  $\text{NPQ} = (F_m - F'_m)/F'_m$  egyenlettel számoltuk ki Bilger és Björkman (1990) alapján. Az NPQ energiafüggő qE komponensét Thiele és munkatársai (1997) módszere szerint határoztuk meg a  $qE = (F_m/F'_m) - (F_m/F''_m)$  alapján, ahol az  $F''_m$  a maximális fluoreszcencia szint az aktinikus fény kikapcsolását követő tíz perces sötétrelaxáció után.

A modulált Chl fluoreszcencia paraméterek aktinikus fényre adott válaszgörbéit és időfüggvény görbéit sötétadaptált leveleken mértük a PAM 200 (Teaching PAM, Walz, Németország) pulzus amplitudó modulált fluorométerrel; a van Kooten és Snel (1990) szerinti nomenklatúrát használtuk. A fényintenzitás-függés mérések esetén a 60 percig sötétadaptált levélen meghatároztuk a fluoreszcencia alapszintjét ( $F_o$ ) és a maximális fluoreszcencia hozamot ( $F_m$ ) egy 1 s időtartamú ( $\lambda \approx 650 \text{ nm}$ ) telítési fényimpulzussal ( $3000 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (mely elegendő valamennyi PSII RC záródásához). Ezt követően öt percen keresztül  $210 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  aktinikus fénnel történő előmegvilágítást alkalmaztunk, mely elősegítette a minta fényadaptálódását, valamint néhány Calvin-ciklus enzim aktivációját, majd elkezdődött a görbe fevétele, mely 60-1250  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  intervallumban, tíz lépcsőben valósult meg; valamennyi fényintenzitás időtartama öt perc volt. A maximális Chl fluoreszcencia paraméter kioltott szintjeit ( $F'_m$ ) és a steady-state fluoreszcencia hozamokat ( $F$ ) valamennyi fényintenzitáson meghatároztuk a megvilágítás végén. Az egyes fényintenzitásokon az aktinikus fény kikapcsolása után 5 s időtartamú távoli vörös fényt alkalmaztunk, hogy meghatározzuk az  $F'_o$  értékeket. A mért paraméterekből ( $F_o$ ,  $F_m$ ,  $F'_o$ ,  $F'_m$  és a steady-state fluoreszcencia szint,  $F$ ) kiszámítottuk a PSII maximális hatásfokát  $F_v/F_m$  sötétadaptált levélen, a fotokémiai kioltási koeficiens értékét  $qP = (F'_m - F)/(F'_m - F'_o)$ , a PSII RC-ra ható gerjesztési nyomást  $1 - qP$ , a PSII fotokémiájának relatív hatásfokát ( $\Phi_{\text{PSII}} = (F'_m - F)/F'_m = \Delta F/F'_m$ ) és a nem-fotokémiai kioltási paraméter  $\text{NPQ} = (F_m - F'_m)/F'_m$  értékét Schreiber és munkatársai (1986), Genty és munkatársai (1989), Bilger és Björkman (1990) szerint. A PSII-n keresztüli lineáris elektrontranszport sebességének kiszámításához ( $J_{\text{ETR}}$ ) a

következő egyenlet alapján jutottunk:  $J_{ETR} = \Phi_{PSII} \times PPFD \times 0,84 \times 0,5$  (Schreiber *et al.*, 1994), ahol a PPFD a fotoszintetikusan aktív foton denzitás (Photosynthetically Active Photon Flux Density) a levélfelületen; a 0,5 faktor a két fotoszisztéma között feltételezhetően egyenlően megoszló gerjesztésre utal, és a 0,84 faktor a beeső fény levél által elnyelt hányada. A mérések során a PSII gerjesztéséhez vörös ( $\lambda_{max} = 655$  nm) aktinikus fényt használtunk.

Az NPQ indukcióját és sötétrelaxációját két órán át sötétadaptált leveleken határoztuk meg. A leveleket 15 percen keresztül  $1250 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  vörös fénnel világítottuk meg, amelyet tíz perces sötét követett. Az első 1 s időtartamú  $3000 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fényintenzitású telítési impulzus a megvilágítás kezdete után a tizedik másodpercben érkezett, és 60 s-ként ismétlődött a mérés végéig.

#### 4.7.3. A PSII-ben elnyelt fényenergia megoszlásának vizsgálata

A PAM 200 készülékkel mért Chl fluoreszcencia paramétereket ( $F_o$ ,  $F_m$ ,  $F'_o$ ,  $F'_m$  és  $F$ ) felhasználva két modell alapján meghatároztuk a PSII antennájában elnyelt fényenergia sorsát, mely egyrészt fotokémiailag hasznosulhat, másrészt termálisan disszipálódhat a környezetbe.

Demmig-Adams és munkatársai (1996) modellje szerint a fotokémia által hasznosuló energia frakciót a  $\Phi_{PSII} = (F'_v/F'_m) \times qP$  formulával definiáltuk, ahol az  $F'_v/F'_m$  a nyitott PSII RC-ok fotokémiájának hatásfoka ( $F'_v = F'_m - F'_o$ ) és a  $qP = (F'_m - F)/(F'_m - F'_o)$  a fotokémiai kioltási koefficiens. A hődisszipációt az  $1 - F'_v/F'_m$  képlettel definiáltuk, mely felosztható a sötétben bekövetkező energiavesztés  $\Phi_{DD} = 1 - F_v/F_m$  és a fényben disszipálódó hőenergia frakcióira  $\Phi_{DL} = F_v/F_m - F'_v/F'_m$ . A többlet energia frakciót ( $\Phi_E$ ), amely nem hasznosul a fotokémia folyamán, és hőként sem disszipálódik, az  $(F'_v/F'_m) \times (1 - qP)$  képlettel számoltuk ki.

A Hendrickson és munkatársai (2004) által leírt ún. PSII komplementer hatásfokok koncepciója szerint a PSII fotokémiájának hatásfoka a  $\Phi_{PSII} = (F'_m - F)/F'_m = \Delta F/F'_m$  egyenlet alapján számolható. A nem-fotokémiai energia disszipáció regulált és nem-regulált módon mehet végbe, és ezeket a  $\Phi_{NPQ} = (F/F'_m) - (F/F_m)$  és  $\Phi_{NO} = F/F_m$  képletekkel határoztuk meg. A  $J_{NPQ}$  és a  $J_{NO}$  energia disszipáció sebességeket a  $J_{ETR}$  meghatározásával azonos módon becsültük meg.

#### 4.8. Fotoszintetikus pigmenttartalom meghatározás

A HPLC és spektrofotometriás pigment meghatározás céljából korongokat vágunk ki a levelek azonos részeiből, és folyékony nitrogénben tároltuk azokat. A Chl és összkarotinoid tartalom meghatározását 80%-os acetonos extraktumban Lichtenthaler (1987) spektrofotometriás módszere alapján végeztük. A HPLC analízis kivitelezése Váradi és munkatársai (2003) módszere szerint történt. A pigmentek feltárását Eppendorf csövekben, cseppfolyós nitrogénben történt mechanikai feltárást követően, 85:15 arányú aceton-víz extraháló oldattal végeztük, 24 órára hűtőszekrénybe helyezve, majd az elegyet centrifugálva (10 perc, 9000×g). A xantofill ciklus összkészletének meghatározásához a szilárd maradékot acetonnal kétszer újra extraháltuk. A pigmentek szétválasztásához 5 µm átlagos szemcseméretű, 25 cm-es C18 fordított fázisú (Nucleosil vagy Hypersil) oszlopon (A) acetonitril-víz (9:1, v/v) – (B) etilacetát oldószerszerrendszerral gradiens elúciót alkalmaztunk (térfogatáram: 1 ml min<sup>-1</sup>; a B% (v/v) az injektálástól mért 18. percben zérusról indulva lineáris felfutással elérte a 32%-ot, majd hat perc alatt a 100%-ot, s újabb hat percre ezt az értéket tartotta, ezt követően pedig tíz percen át az A-eluenssel hoztuk egyensúlyba az oszlopot). A xantofill ciklus pigmentek mennyiségét 450 nm-nél detektáltuk, standard anyagként a Roche (Svájc) cégtől származó tiszta zeaxantin szolgált. A kapott kromatogramok integrálása után, a meghatározott területek alapján kiszámoltuk a violaxantin (Vio), anteraxantin (Ant) és zeaxantin (Zea) mennyiségét, vagy %-os megoszlását. A xantofill ciklus komponenseinek egymásba való átalakulását a xantofill ciklus pigmentek de-epoxidációs állapotával  $DE_i = [\frac{1}{2} \times Ant + Zea] / [Vio + Ant + Zea]$  jellemeztük. A xantofill ciklus készletének méretét a  $Vio + Ant + Zea$  (µmol m<sup>-2</sup>) összmenyiségeként számítottuk ki. A méréseket kezdetben LKB 2249 gradiens pumpa, 20 µl-es Rheodyne injektor, Nucleosil-100 C18/5 µm/250×4,6 mm oszlop, LKB 2151 UV/VIS detektor (450 nm), Nelson interface & software/IBM XT összeállítású műszersoron, későbbiekben hűthető automata mintaváltóval felszerelt, PC-vezérelt Perkin-Elmer Series 200 HPLC berendezésen végeztük.

#### 4.9. DNS izolálás és PCR amplifikáció, PsbS és PsbA (D1) fehérjét kódoló DNS szakaszok szekvenálása

Négy hetes *S. nigrum* vonalak leveleiből ZenoGene Plant DNA Isolation Kit (Zenon Biotechnológiai kft., Magyarország) felhasználásával növényi össz-DNS-t izoláltunk a gyártó utasításai szerint. A *psbS* és a *psbA* gének PCR amplifikációjához 50 ng DNS-t használtunk templátként. Három *psbS*-specifikus primer pár (2. táblázat) segítségével ~600 bp, ~1360 bp és ~159 bp átfedő fragmenteket szaporítottunk fel a két *S. nigrum* szülői vonalból. A SniD1 primerekkel (2. táblázat) a D1 protein mutáns (AR, ARF2, ARF6) és a vad-típusú (AS, ASF2, ASF6) vonalakban felszaporítottuk a *psbA* gén 386 bp-os DNS fragmentjét, mely tartalmazta az A → G nukleotid cserét (S264G mutáció). A PCR ciklusok a következők voltak: denaturáció 94°C 3 perc, azután 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 15-60 s 35 cikluson át, majd a reakciót egy 4 perces 72°C-os lépéssel fejeztük be. Az amplifikáció termékeit 2%-os agaróz gélben választottuk el, majd a fragmenteket visszaizoláltuk az Agarose DNA Isolation Kit segítségével (Zenon Biotechnológiai kft., Magyarország) és pGEM-T Easy vektorba (Promega Corp., USA) klónoztuk a gyártó utasításainak megfelelően. A szekvenálási reakciót ABI BigDye Terminator v3.1 kittel végeztük, és a termékeket ABI3100 mikrokapilláris lézer szekvenátoron futattuk (Applied Biosystems Inc., USA).

2. táblázat A *psbS* és a *psbA* gének PCR amplifikációjához használt primer szekvenciák

Primer	Primer szekvencia
Pr-SniF1	5'-TGAAGTTGTTAAGAATAAGC-3'
Pr-SniR1	5'-TCATTATTCTATTAAAGGCT-3'
Pr-SniF2	5'-GGCCGTGTTGCTATGATT-3'
Pr-SniR2	5'-TAATCCTGGTACTGGCAAAT-3'
Pr-SniStop-F1	5'-CAGGTGTCCCAATCAAT-3'
Pr-SniStop-R1	5'-CTACACATAAGTCATACACA-3'
SniD1_F1	5'-CCCAATCGGTCAAGGAAGTTTTT-3'
SniD1_R1	5'-CAGGCCAAGCAGCTAGGAAGAAGT-3'

#### 4.10. Immunoblot analízis

A levelek PsbA (D1) és PsbS fehérje tartalmait immunoblot analízissel határoztuk meg. 2,3 cm<sup>2</sup>-nek megfelelő területű korongokat vágunk ki az AS és az AR *S. nigrum* leveleiből, melyeket folyékony nitrogénben fagyasztottunk, majd finom porrá őröltünk, és 500 µl Laemmli puffer (100 mM TRIS pH 6,8, 4% SDS, 10% glicerol, 200 mM DTT, 5 mM PMSF) hozzáadásával elhomogenizáltunk. A homogenizátumokat 90°C-on öt percig inkubáltuk, amelyet egy 20 perces 37°C-os inkubáció követett, majd a fehérjét SDS-poliakril-amid gélelektroforézissel (Laemmli, 1970) választottuk el 1 mm vastag, 15%-os gélen 37,5:1 akril-amid:bisakrilamid arány mellett. Minden egyes zsebbe 5 µl mintát vittünk fel.

Az elválasztott fehérjét nitrocellulóz membránra (Protran, Schleicher & Schuell) blottoltuk át metanol tartalmú pufferrel (25 mM TRIS, 192 mM glicin, 20% metanol). A nitrocellulóz membránokat 5%-os tejport tartalmazó TBS-T pufferben (10 mM TRIS pH 8,0, 0,15 M NaCl, 0,1% Tween 20) két órán át blokkoltuk, és két órán keresztül inkubáltuk PsbA és PsbS (Agrisera) fehérjék elleni elsődleges antitestekkel, melyeket 5% tejport tartalmazó TBS-T pufferben hígítottunk ki (1:6000 és 1:3000 arányban). A membránokat háromszor öt percig mostuk TBS-T pufferben és kecskéből származó anti-nyúl IgG torma peroxidázzal (HRP) konjugált másodlagos ellenanyaggal (Millipore) két órán át inkubáltuk 1:5000 hígítási arányban 5% tejport tartalmazó TBS-T pufferben. Háromszor öt perces TBS-T pufferrel történő mosás után az immunoblottolt membránokat öt percen át inkubáltuk ECL plus HRP szubsztrátban (GE Healthcare Bio-Sciences) és a kemilumineszcenciát Hyperfilm ECL fotografikus filmen (GE Healthcare Bio-Sciences) detektáltuk. Az előhívott filmet digitalizáltuk és 1D Scan programcsomag segítségével analizáltuk.

#### 4.11. Statisztikai analízis

A vizsgálati eredmények statisztikai feldolgozásához és kiértékeléséhez a Student t-tesztet használtuk, a gyakorisági eloszlások hasonlóságát  $\chi^2$  próbával ellenőriztük. A dolgozatban a szignifikáns eltéréseket különböző tévedési valószínűségi szinteken jelöltük (a, b és c 0,1, 1 és 5%).

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. Az elnyelt fényenergia hasznosításának összehasonlító vizsgálata a *S. nigrum* kétféle biotípusában és a különböző növénynemzedékekben

Egy anyai öröklődésű faktor, a D1 fehérje hatásának vizsgálata céljából a *S. nigrum* AS és AR szülő biotípusai között reciprok keresztezéseket végeztünk az F6 nemzedékig. Az így nyert izonukleáris növényvonalak fotoszintetikus jellemzése mellett vizsgáltuk a D1 fehérje S264G mutációjának hatását az elnyelt fényenergia sorsára. A keresztezések sikerességét, vagyis a különböző vonalak sejtmagi hibridstátuszának meglétét egy mendeli tulajdonság öröklődésének nyomonkövetésével bizonyítottuk.

#### 5.1.1. A *S. nigrum* biotípusok és vonalak fotoszintetikus jellemzése

A 3. táblázatban a *S. nigrum* vonalak néhány állandósult (steady-state) fotoszintetikus paraméterét mutatom be. Az infravörös gázelemző segítségével meghatározott maximális asszimilációs ráták ( $A_{\max}$ ) közel azonosak voltak az AS és AR szülő biotípusokban, valamint ezek reciprok keresztezéseiből való F1 és F2 hibridekben is. Valamennyi AR vonal (AR, ARF1, ARF2) sötétadaptált leveleiben a PSII maximális hatásfoka ( $F_v/F_m$ ) alacsonyabbnak bizonyult, mint a vad típusokban (AS, ASF1, ASF2). Szignifikáns különbségek adódtak az NPQ és a qE kioltási koefficiens értékeiben nemcsak a szülői AS és AR biotípusok között, hanem ezek F1 és F2 utódaiban is (Student t-teszt). Az anyától örökölt vad fenotípusú/genotípusú (AS, ASF1, ASF2) vonalakban a steady-state NPQ szintje elérte a kb. 2,6 értéket, ezzel szemben valamennyi AR vonalban (AR, ARF1, ARF2) az NPQ kb. 50%-kal alacsonyabb volt (4. táblázat). Az NPQ gyorsan relaxálódó komponense, a  $\Delta pH$ -függő qE, még kifejezettebb, 60-70%-os esést mutatott az AR vonalakban a vad típusokhoz képest. A lassan relaxálódó vagy qI értékek viszont megnöttek az AR vonalakban a qE rovására.

Az alkalmazott nevelési körülmények között az AR vonalak kissé alacsonyabb összes Chl ( $a + b$ ) tartalmakkal bírtak, és szignifikánsan alacsonyabb Chl  $a/b$  arányokkal, mint az AS párjaik (4. táblázat). Azonban nem találtunk szignifikáns eltéréseket az AS és AR típusokban a karotinoid összetétel, a xantofill ciklus készlet méret, vagy a xantofill ciklus készlet méret és

Chl tartalom aránya tekintetében. A megvilágított levelekben a xantofill de-epoxidációs index (DEi) 20%-kal bizonyult alacsonyabbnak valamennyi AR vonalban (3. táblázat), habár a különböző *S. nigrum* vonalak xantofill ciklus készlet méretében nem volt szignifikáns eltérés.

**3. táblázat** A különböző *S. nigrum* vonalak fotoszintetikus tulajdonságai

Paraméter	Biotípus					
	AS	AR	ASF1	ARF1	ASF2	ARF2
$A_{max}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	18,4 $\pm$ 1,4	17,5 $\pm$ 1,7	17,8 $\pm$ 1,6	17,9 $\pm$ 1,5	18,1 $\pm$ 1,2	17,8 $\pm$ 1,4
$F_v/F_m$	0,830 $\pm$ 0,014	0,815 $\pm$ 0,015	0,824 $\pm$ 0,012	0,809 $\pm$ 0,019	0,825 $\pm$ 0,010	0,811 $\pm$ 0,012
NPQ	2,53 $\pm$ 0,21	1,32 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	2,65 $\pm$ 0,22	1,24 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	2,59 $\pm$ 0,18	1,33 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>
qE	2,18 $\pm$ 0,12	0,72 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	2,24 $\pm$ 0,16	0,75 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	2,28 $\pm$ 0,20	0,81 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>
qI	0,35 $\pm$ 0,03	0,60 $\pm$ 0,10 <sup>c</sup>	0,41 $\pm$ 0,04	0,49 $\pm$ 0,06	0,31 $\pm$ 0,04	0,52 $\pm$ 0,16
DEi	0,67 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,67 $\pm$ 0,02	0,55 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,65 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>

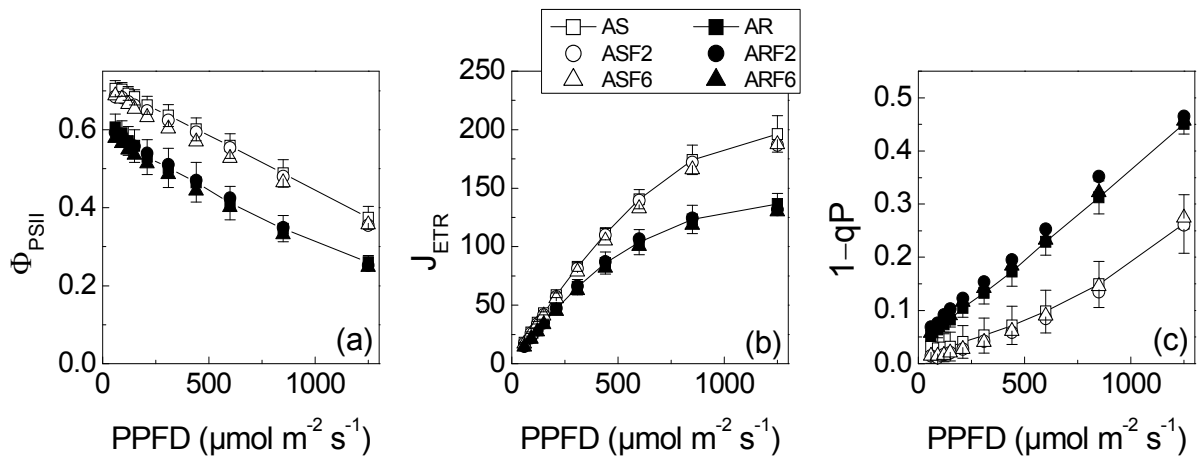
AS, vad biotípus; AR, D1 mutáns; ASF1 és ARF1, a szülői AS és AR biotípusok reciprok keresztezésiből való F1 hibridek; ASF2 és ARF2, F2 hibridek;  $A_{max}$ , maximális asszimilációs ráta ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $F_v/F_m$ , PSII maximális hatásfoka; NPQ, steady-state nem-fotokémiai kioltás ( $1600 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 15 perc); qE, az NPQ gyorsan relaxálódó komponense; qI, az NPQ lassan relaxálódó komponense; DEi, a xantofill pigmentek steady-state de-epoxidációs indexe ( $\frac{1}{2} \times \text{Ant} + \text{Zea} / (\text{Vio} + \text{Ant} + \text{Zea})$ ). Az adatok három független kísérletből 12 ismétlés átlagai  $\pm$  SD. Az “a és c” szignifikáns eltérést jelölik a kétféle biotípus között 0,1 és 5%-os tévedési valószínűségi szinten.

**4. táblázat** A különböző *S. nigrum* vonalak pigment összetétele

Pigment	Biotípus					
	AS	AR	ASF1	ARF1	ASF2	ARF2
Chl a ( $\mu\text{mol m}^{-2}$ )	212 $\pm$ 8	191 $\pm$ 5	220 $\pm$ 8	181 $\pm$ 8	216 $\pm$ 5	194 $\pm$ 3
Chl b ( $\mu\text{mol m}^{-2}$ )	67 $\pm$ 4	71 $\pm$ 3	70 $\pm$ 4	76 $\pm$ 2	69 $\pm$ 4	71 $\pm$ 4
Chl a/b	3,17 $\pm$ 0,02	2,71 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	3,12 $\pm$ 0,03	2,36 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	3,14 $\pm$ 0,02	2,72 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
Karotinoidok ( $\mu\text{mol m}^{-2}$ )	83 $\pm$ 2	78 $\pm$ 2	86 $\pm$ 4	82 $\pm$ 2	83 $\pm$ 3	81 $\pm$ 2
Chl (a+b)/Karotinoidok	3,36 $\pm$ 0,2	3,36 $\pm$ 0,2	3,37 $\pm$ 0,1	3,13 $\pm$ 0,2	3,43 $\pm$ 0,2	3,27 $\pm$ 0,2
Vio+Ant+Zea ( $\mu\text{mol m}^{-2}$ )	15,7 $\pm$ 1,4	14,4 $\pm$ 1,7	15,6 $\pm$ 1,9	14,6 $\pm$ 1,0	15,6 $\pm$ 0,5	14,9 $\pm$ 1,2
(Vio+Ant+Zea)/(Chl (a+b)) ( $\mu\text{mol mmol}^{-1}$ )	56 $\pm$ 3	54 $\pm$ 3	54 $\pm$ 4	57 $\pm$ 5	55 $\pm$ 2	56 $\pm$ 4

Az adatok három független kísérletből öt ismétlés átlagai  $\pm$  SD. Az “a” szignifikáns eltérést jelöli a két biotípus között 0,1%-os tévedési valószínűségi szinten

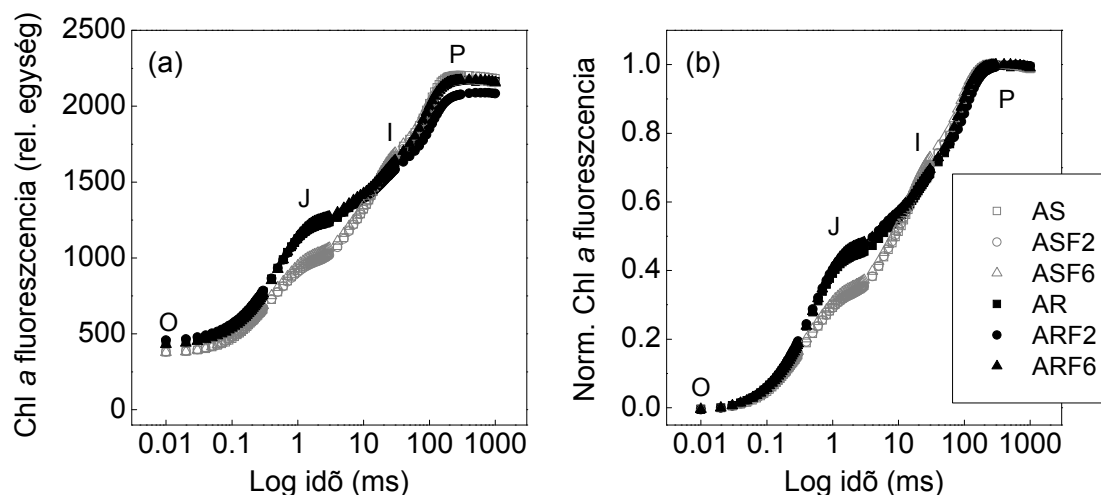
A 5. ábrán a különböző *S. nigrum* vonalakban néhány fluoreszcencia kioltási paraméter fényintenzitás függésének összehasonlítását mutatom be: (a) a PSII fotokémiájának hatásfoka ( $\Phi_{PSII}$ ); (b) a lineáris elektrontranszport ráta ( $J_{ETR}$ ); és (c) a PSII-re ható gerjesztési nyomás ( $1 - qP$ ). Az emelkedő fényintenzitással a  $\Phi_{PSII}$  fokozatosan csökkent, míg a  $J_{ETR}$  és az  $1 - qP$  növekedett valamennyi biotípusban és vonalban. A  $\Phi_{PSII}$  és a  $J_{ETR}$  (5. a és b ábrák) szignifikánsan alacsonyabb értékeket vettek fel a növekvő fényintenzitásokkal az AR vonalakban, mint a vad, AS típusokban. Az AR vonalakban a PSII-re ható gerjesztési nyomás (5. c ábra), ezáltal a redukált  $Q_A$  koncentrációja, szignifikánsan magasabb volt a közepes és a magas fényintenzitásokon, mint az AS párjaikban ( $p=0,01$ ).



**5. ábra** A PSII fotokémiájának hatásfoka ( $\Phi_{PSII}$ , a), a lineáris elektrontranszport ráta ( $J_{ETR}$ , b) és a PSII-re ható gerjesztési nyomás ( $1 - qP$ , c) fényintenzitás függése a vad-típusú (AS, ASF2, ASF6) és a D1 mutáns (AR, ARF2, ARF6) *S. nigrum* vonalakban. AS és AR, szülő,  $\square$  és  $\blacksquare$ ; ASF2 és ARF2,  $\circ$  és  $\bullet$ ; ASF6 és ARF6,  $\triangle$  és  $\blacktriangle$ . Az adatok három független kísérletből 12 ismétlés átlagai. A SD a szülő (AS és AR) populációkban van feltüntetve.

A *S. nigrum* növények mért és a relatív változó  $(F_t - F_0)/(F_m - F_0)$  Chl fluoreszcencia tranzienseinek átlagértékei a 6. a és b ábrákon láthatók. Megállapíthatjuk, hogy mindkét biotípusban a kinetikák tipikus OJIP tranzienseket mutatnak. A 20  $\mu\text{s}$ -nál mért fluoreszcencia szintet tekintettük  $F_0$ -nak, a J szintet kb. 1,5-2 ms-nál, az I szintet kb. 30 ms-nál és a maximális, P szintet ( $F_m$ ) kb. 200 ms-nál éri el a tranziens az AS vonalakban, és később, kb. 280 ms-nál az AR biotípusokban. Szemmel láthatóan az S264G D1 mutáció hatással van a

tranziensek alakjára, és a szülő biotípus és a megfelelő hibridjei nem különböztek egymástól. Az AR típusokban az  $F_o$  és  $F_j$  szintek szignifikánsan magasabb értékeket mutattak ( $p=0,05$ ), az  $F_m$  szintek pedig alacsonyabbakat (az ARF2 kivételével), mint az AS párjaikban. Az  $F_1$  tranziens kevésbé kifejezetten jelent meg az AR, mint az AS típusban, azonban szignifikáns különbség csupán az  $F_2$  hibridek esetében adódott.



**6. ábra** Gyors Chl fluoreszcencia tranziensek (OJIP) AS (üres szimbólum) és AR (teli szimbólum) *S. nigrum* biotípusok leveleiben és hibridjeikben, melyeket 1 s időtartamig,  $3000 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotonáram-sűrűséggel világítottunk meg. AS és AR, szülő,  $\square$  és  $\blacksquare$ ; ASF2 és ARF2,  $\circ$  és  $\bullet$ ; ASF6 és ARF6,  $\triangle$  és  $\blacktriangle$ . A mért görbéket logaritmikus időskálán ábrázoltuk (a). A (b) panel a változó fluoreszcenciára ( $F_v$ ) normalizált görbéket mutatja,  $(F_t - F_o)/(F_m - F_o)$ . Az adatok három független kísérlet egyikét reprezentálják, ahol  $n = 16$ .

A 5. táblázatban bemutatom a *S. nigrum* vonalakra jellemző JIP-teszt paramétereket. Az AR növényekben a PSII primér fotokémiájának maximális hatásfoka ( $\phi_{Po} = F_v/F_m$ ) szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult AS párjaikkal szemben. A RC-ok záródásának nettó sebessége, azaz a normalizált fluoreszcencia görbe kezdeti meredeksége ( $M_o$ ), szignifikánsan megnőtt a  $Q_A$  redukált formájának fokozott felhalmozódása miatt ( $V_j$ ) az AR típusokban.

5. táblázat JIP-teszt paraméterek a különböző *S. nigrum* vonalakban

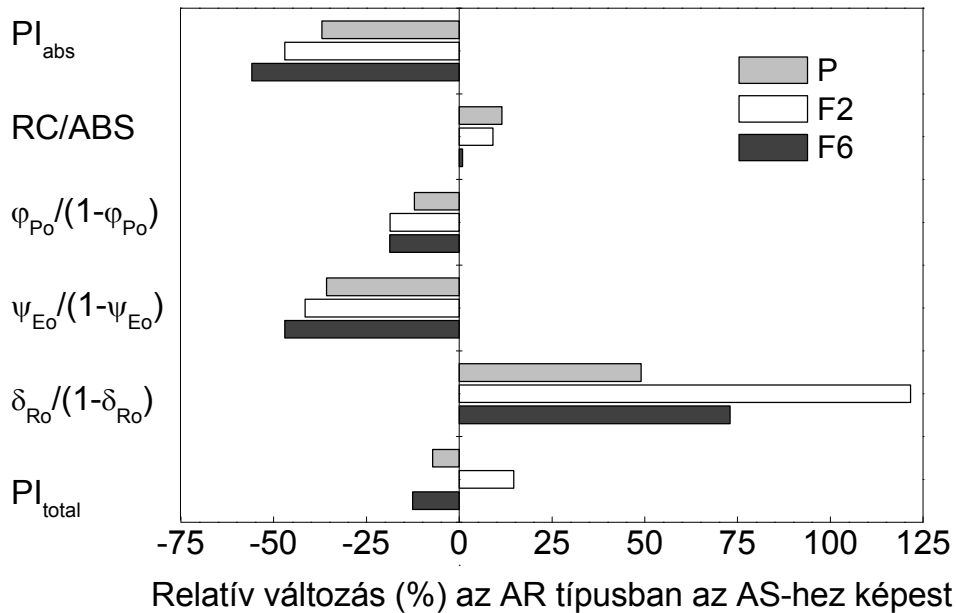
JIP-teszt paraméter	Biotípus					
	AS	AR	ASF2	ARF2	ASF6	ARF6
$\Phi_{Po}$ ( $F_v/F_m$ )	0,821 ± 0,007	0,801 ± 0,011 <sup>a</sup>	0,826 ± 0,003	0,793 ± 0,023 <sup>a</sup>	0,829 ± 0,003	0,796 ± 0,026 <sup>a</sup>
$\Phi_{Do}$	0,179 ± 0,007	0,199 ± 0,011 <sup>a</sup>	0,174 ± 0,003	0,207 ± 0,023 <sup>a</sup>	0,171 ± 0,003	0,204 ± 0,026 <sup>a</sup>
$M_o$	0,787 ± 0,108	0,906 ± 0,062 <sup>a</sup>	0,769 ± 0,048	0,913 ± 0,086 <sup>a</sup>	0,728 ± 0,045	0,986 ± 0,091 <sup>a</sup>
$V_J$	0,382 ± 0,036	0,497 ± 0,014 <sup>a</sup>	0,382 ± 0,013	0,517 ± 0,024 <sup>a</sup>	0,374 ± 0,016	0,528 ± 0,013 <sup>a</sup>
$V_I$	0,784 ± 0,034	0,776 ± 0,020	0,768 ± 0,028	0,727 ± 0,019 <sup>b</sup>	0,762 ± 0,026	0,761 ± 0,025
$\Psi_{Eo}$	0,618 ± 0,036	0,505 ± 0,021 <sup>a</sup>	0,618 ± 0,013	0,486 ± 0,023 <sup>a</sup>	0,626 ± 0,016	0,471 ± 0,013 <sup>a</sup>
$\Phi_{Eo}$	0,507 ± 0,025	0,405 ± 0,019 <sup>a</sup>	0,511 ± 0,011	0,385 ± 0,025 <sup>a</sup>	0,519 ± 0,015	0,373 ± 0,019 <sup>a</sup>
$\Psi_{Ro}$	0,216 ± 0,034	0,224 ± 0,021	0,232 ± 0,015	0,258 ± 0,019 <sup>b</sup>	0,237 ± 0,029	0,244 ± 0,029
$\Phi_{Ro}$	0,177 ± 0,027	0,179 ± 0,016	0,192 ± 0,023	0,218 ± 0,018	0,197 ± 0,022	0,193 ± 0,026
$\delta_{Ro}$	0,348 ± 0,041	0,447 ± 0,038 <sup>a</sup>	0,376 ± 0,042	0,573 ± 0,065 <sup>a</sup>	0,379 ± 0,032	0,518 ± 0,064 <sup>a</sup>
$ET_o/RC$	1,285 ± 0,064	0,872 ± 0,044 <sup>a</sup>	1,242 ± 0,050	0,862 ± 0,060 <sup>a</sup>	1,218 ± 0,036	0,876 ± 0,059 <sup>a</sup>
$RE_o/RC$	0,426 ± 0,044	0,422 ± 0,049	0,483 ± 0,064	0,496 ± 0,086	0,462 ± 0,045	0,441 ± 0,055
$PI_{abs}$	29,60 ± 5,62	18,77 ± 3,59 <sup>a</sup>	31,79 ± 3,27	16,85 ± 4,93 <sup>a</sup>	34,98 ± 3,57	15,42 ± 3,41 <sup>a</sup>
$PI_{total}$	16,29 ± 4,94	15,12 ± 3,56	19,31 ± 3,91	22,15 ± 3,29 <sup>c</sup>	19,22 ± 4,14	16,80 ± 4,08 <sup>c</sup>

Az adatok három független kísérlet egyikét reprezentálják, ahol  $n = 16$ .

Az "a, b, és c" szignifikáns eltérést jelölik a két biotípus között 0,1, 1 és 5%-os tévedési valószínűségi szinten.

**Magyarázat:**  $\Phi_{Po}$  ( $F_v/F_m$ ), PSII primér fotokémiájának maximális hatásfoka;  $\Phi_{Do}$ , energia disszipáció hatásfoka;  $M_o$ , fluoreszcencia tranziens  $V = f(t)$  approximatív kezdeti meredeksége ( $ms^{-1}$ ), a RC-k záródásának nettó sebessége;  $V_J$ , relatív változó fluoreszcencia a J inflexiónál, mely tükrözi mind a  $Q_A^-$  felhalmozódásának, mind re-oxidációjának sebességét;  $V_I$ , relatív változó fluoreszcencia az I inflexiónál, mely a plasztokinol re-oxidációjának sebességét tükrözi;  $\Psi_{Eo}$ , annak a valószínűsége, hogy egy RC által befogott exciton egy elektront az elektrontranszportláncba juttat a  $Q_A^-$ -n túl;  $\Phi_{Eo}$ , elektrontranszport hatásfoka a köztes elektron hordozók irányában (azaz egy elnyelt foton milyen hatásfokkal eredményez elektrontranszportot a  $Q_A^-$ -n túl);  $\Psi_{Ro}$ , annak a valószínűsége, hogy egy RC által befogott exciton egy elektront az elektrontranszportláncba juttat a  $Q_A^-$  felől a PSI végső elektron akceptorokhoz;  $\Phi_{Ro}$ , a PSI végső elektron akceptorok redukciójának hatásfoka az elnyelt fotonok arányában;  $\delta_{Ro}$ , annak a valószínűsége, hogy egy elektron a köztes elektron akceptorok felől a PSI végső elektron akceptorokhoz jut;  $ET_o/RC$ , elektrontranszport fluxusa (a  $Q_A^-$ -on túlra definiált) per RC;  $RE_o/RC$ , PSI végső elektron akceptor redukciójának fluxusa per RC;  $PI_{abs}$ , a PSII által elnyelt fotonoktól a köztes elektron akceptorok redukciójáig tartó energia konverziót jellemző fotoszintetikus teljesítmény index;  $PI_{total}$ , a PSII által elnyelt fotonoktól a PSI végső elektron akceptorokig tartó energia konverziót jellemző teljes fotoszintetikus teljesítmény index.

További informatív paraméterek értékei, úgymint (i) annak a valószínűsége, hogy egy RC által befogott exciton egy elektront az elektrontranszportláncba juttat a  $Q_A^-$ -n túl ( $\psi_{Eo}$ ), (ii) az elektrontranszport fluxusa per RC ( $ET_o/RC$ ) és (iii) a fotoszintetikus teljesítmény index ( $PI_{abs}$ ) valamennyien szignifikánsan csökkentek, míg az energia disszipáció határfoka ( $\phi_{Do}$ ) megemelkedett az AR típusokban, az AS vonalakhoz képest (5. táblázat). A mutációt hordozó vonalak  $PI_{abs}$  értékei 50%-os csökkenést mutattak, ami a szignifikánsan alacsonyabb gerjesztési energia befogási aránynak  $\phi_{Po}/(1 - \phi_{Po})$ , valamint a gerjesztési energia elektrontranszportba történő kisebb arányú konverziójának  $\psi_{Eo}/(1 - \psi_{Eo})$  köszönhető (7. ábra).



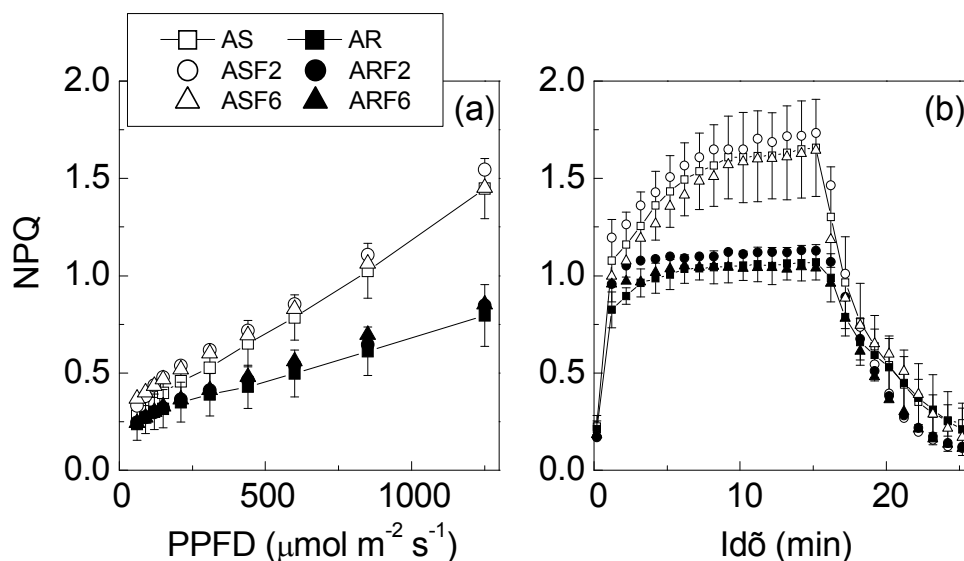
**7. ábra** A D1 protein mutáció hatása a fotoszintetikus teljesítmény indexekre ( $PI_{abs}$  és  $PI_{total}$ ), és komponenseikre, nevezetesen: (1) a  $Q_A$ -redukáló RC-ok per PSII antenna Chl (RC/ABS); (2) a gerjesztési energia befogás és disszipáció aránya ( $Q_A^-$ -ig definiálva) ( $\phi_{Po}/(1 - \phi_{Po})$ ); (3) az elektrontranszportba történő gerjesztési energia konverzió (és konkurrens disszipáció) aránya ( $Q_A^-$ -n túlra definiálva) ( $\psi_{Eo}/(1 - \psi_{Eo})$ ); (4) a redukált köztes elektron akceptorok felől a PSI végső akceptorokhoz eljutó és el nem jutó elektronok aránya ( $\delta_{Ro}/(1 - \delta_{Ro})$ ). AS és AR szülő populáció, a *S. nigrum* vad és D1 mutáns biotípusai; P, szürke oszlop, szülő populáció; és ezek F2 és F6 hibridjei, rendre F2 és F6, fehér és fekete oszlopok. A vízszintes oszlopok a különböző paraméterek relatív változásait jelölik %-ban az AR típusban az AS-hez viszonyítva. Az adatok három független kísérlet egyikét reprezentálják, ahol  $n = 16$ .

Az OJIP tranziensekből JIP-teszt analízissel nyomonkövethető az elektronok vándorlása a redukált köztes elektron akceptoroktól ( $Q_B$ , PQ, Cyt  $b_6/f$  és plasztocianin) a PSI akceptor oldali komponenseinek ( $NADP^+$  és Fd) redukációjáig, valamint meghatározható a teljes, a PSI végső akceptorokig tartó, fotoszintetikus teljesítmény index ( $PI_{total}$ ) (5. táblázat). Annak a valószínűsége, hogy egy elektron a köztes elektron akceptorok felől a PSI végső elektron akceptorokhoz jut ( $\delta_{Ro}$ ), szignifikánsan megemelkedett az AR vonalakban AS párjaikhoz képest, miközben nem találtunk szignifikáns eltéréseket a kétféle biotípusban a PSI végső elektron akceptorok redukációjának fluxusa per RC tekintetében ( $RE_o/RC$ ), a PSI végső elektron akceptorok redukációjának hatásfokában az elnyelt fotonok arányában ( $\phi_{Ro}$ ), valamint annak a valószínűségében sem, hogy egy RC által befogott exciton egy elektront az elektrontranszportláncba juttat a  $Q_A^-$  felől a PSI végső elektron akceptorokhoz ( $\psi_{Ro}$ ). A  $PI_{total}$  a fotoszintetikus teljesítmény index ( $PI_{abs}$ ) és a  $\delta_{Ro}/(1 - \delta_{Ro})$  arányszám szorzata, amely a redukált köztes elektron akceptorok felől a PSI végső akceptorokhoz jutó elektronok aránya. A  $\delta_{Ro}/(1 - \delta_{Ro})$  arányszám emelkedésének köszönhető teljesítmény-növekedés valószínűleg kompenzálhatja a PSII akceptor oldali alacsonyabb elektronáram-sebességet az AR típusban, nem szignifikáns mértékben eltérő  $PI_{total}$  értékeket eredményezve ezzel a kétféle biotípusban (5. táblázat).

#### 5.1.2. Az NPQ és az elnyelt fényenergia allokációja a PSII-ben

A 8. ábra bemutatja az NPQ fényintenzitástól való függését (a), és  $1250 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  aktinikus fénnel történő indukcióját valamint sötétrelaxációját (b). Jellemzően a fényintenzitás emelkedésével az NPQ növekedett valamennyi biotípusban és vonalban. Az AR szülő biotípus és hibridjei szignifikánsan alacsonyabb NPQ kapacitással bírtak, mint az AS párjaik (8. a ábra). A  $\Phi_{PSII}$ ,  $J_{ETR}$ , NPQ és  $1 - qP$  paraméterek fényintenzitás függése a PSII működésének lecsökkent regulációs képességéről árulkodik valamennyi AR típusban (AR, ARF2, ARF6) az AS párjaikkal szemben (AS, ASF2, ASF6) (5. a, b, c és 8. a ábrák). A sötétadaptált levél megvilágítása után az NPQ kialakulása során két fázis különíthető el, egy gyors és egy lassú. Az AS típusokban egy gyors kezdeti emelkedés figyelhető meg, mely kb. 60 s alatt éri el az 1,1 értéket, és jórészt független a xantofill ciklus működésétől (8. b ábra), melyet egy xantofill ciklus függő, lassabb emelkedés követ, 15 perc alatt elérve a közel

steady-state 1,7 értéket. Ezt követően az aktinikus fény kikapcsolása után az NPQ relaxálódott, melynek félléletideje az AS típusokban kb.  $2,8 \pm 0,2$  perc volt.

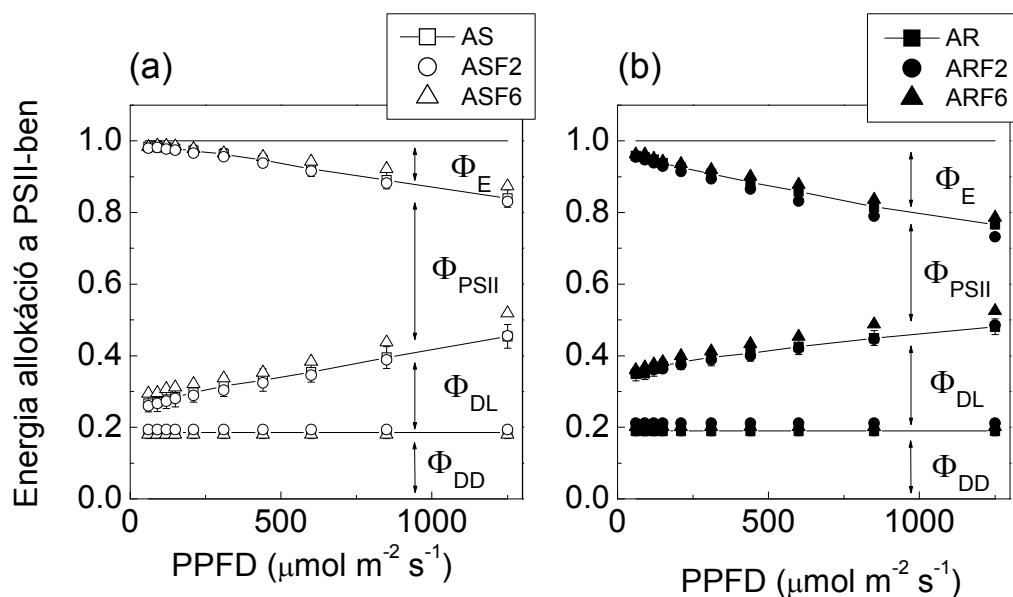


**8. ábra** Az NPQ aktinikus fényre adott válaszgörbéi (a) és az NPQ indukciója ( $1250 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 15 perc) és sötétrelaxációja (b) AS (üres szimbólum) és AR (teli szimbólum) *S. nigrum* biotípusok leveleiben. AS és AR, szülő,  $\square$ – és  $\blacksquare$ –; ASF2 és ARF2,  $\circ$  és  $\bullet$ ; ASF6 és ARF6,  $\triangle$  és  $\blacktriangle$ . Az adatok három független kísérletből 12 ismétlés átlagai. A SD a szülő (AS és AR) populációkban van feltüntetve.

Az AR biotípusban viszont az NPQ legnagyobb része a megvilágítás első percében kialakult, de a gyors kezdeti fázis kb. 25%-kal volt alacsonyabb, mint az AS típusokban. Majd némileg lassan emelkedett és elérte az 1,1-hez közeli steady-state értéket. Az NPQ relaxáció félléletideje kb.  $5,0 \pm 0,3$  perc volt az AR típusok esetében.

A D1 fehérje mutáció hátterének és lehetséges következményeinek megértése érdekében megvizsgáltuk a PSII antenna által elnyelt fényenergia sorsát. Az elnyelt energia egyrészt fotokémiaiilag hasznosulhat, másrészt a disszipatív folyamatok eliminálhatják a PSII antennarendszeréből. A 9. ábra az elnyelt fényenergia PSII-ben történő megoszlásának fényintenzitás függését mutatja be Demmig-Adams és munkatársai (1996) modellje alapján. Mindkét biotípusban a fotokémia által hasznosuló energia frakció ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) csökkenő tendenciát mutatott a beeső fényintenzitás növekedésekor, míg a fényben disszipált energia ( $\Phi_{\text{DL}}$ ) illetve az

ún. többletenergia disszipáció ( $\Phi_E$ ) egyaránt növekedett a fényintenzitás emelkedésével. Az AS és AR szülő biotípusok között és a megfelelő hibridjeik között jellegzetes különbségek mutatkoztak (9. a és b ábrák). A  $\Phi_{PSII}$  szignifikánsan, kb. 30%-kal volt kisebb valamennyi AR vonalban, azonban a  $\Phi_{DL}$  kb. 35%-kal, a  $\Phi_E$  pedig kb. 80%-kal megemelkedett az AR típusokban AS párjaikhoz képest.



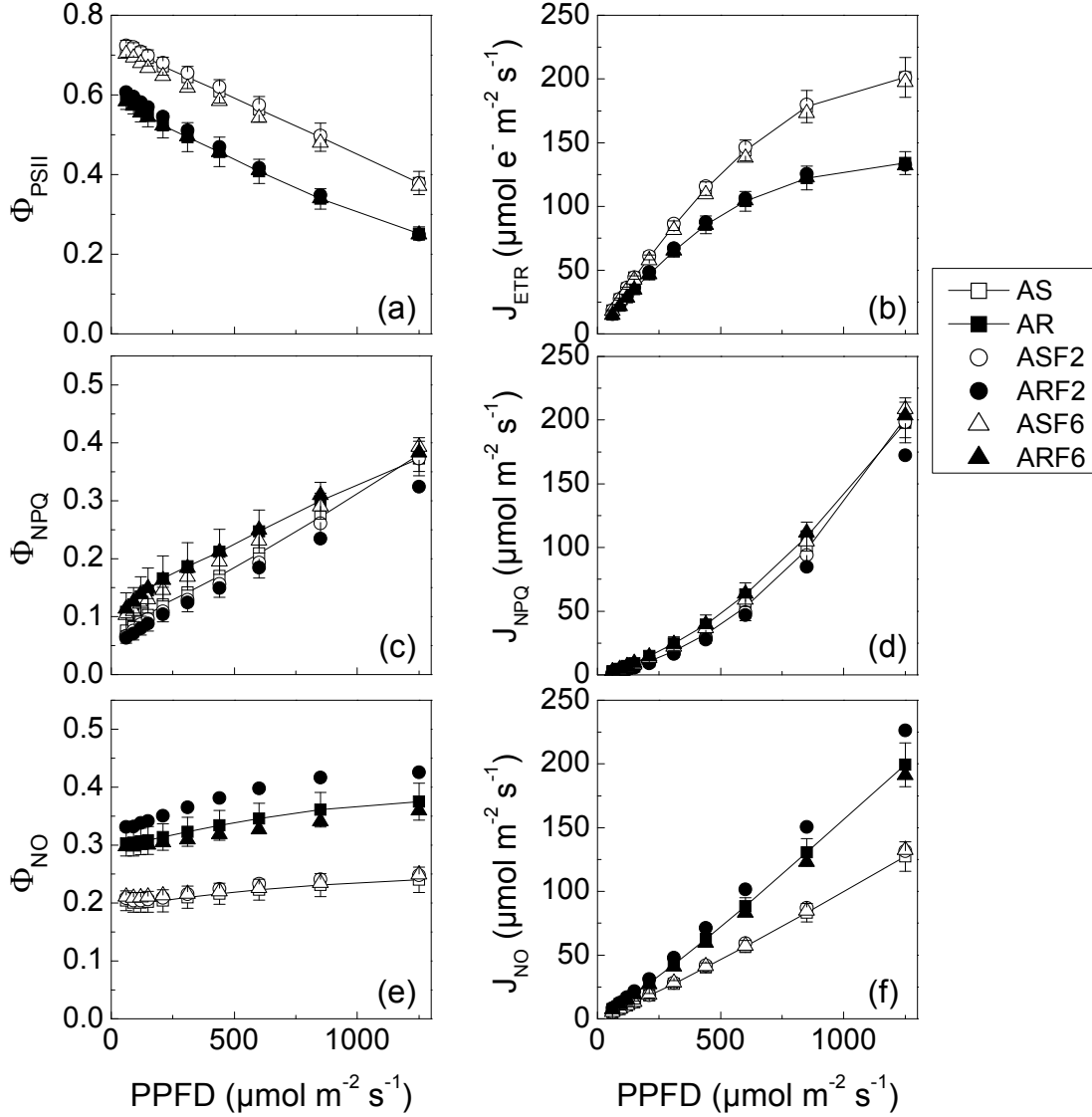
**9. ábra** Az elnyelt fényenergia megoszlása a PSII-ben Demmig-Adams és munkatársai (1996) modellje szerint az AS (üres szimbólum) (a) és az AR (teli szimbólum) (b) *S. nigrum* biotípusok leveleiben és ezek hibridjeiben. AS és AR, szülő,  $\square$  és  $\blacksquare$ ; ASF2 és ARF2,  $\circ$  és  $\bullet$ ; ASF6 és ARF6,  $\triangle$  és  $\blacktriangle$ .  $\Phi_E$ ,  $\Phi_{PSII}$ ,  $\Phi_{DL}$  és  $\Phi_{DD}$ : rendre, a többletenergia, a PSII fotokémiára hasznosuló energia, a fényben történő hődisszipáció és a sötétben történő energiaveszteség frakciói. A nyíllal jelölt, görbék közti területek a megfelelő hatásokkal arányosak. Az adatok három független kísérletből 6-7 ismétlés átlagai. A SD a szülő (AS és AR) populációkban van feltüntetve.

Egy ennél egyszerűbb modell alkalmazásával (Hendrickson *et al.*, 2004) mennyiségileg meghatároztuk a gerjesztési energia allokációját (10. ábra), amely három egymást kiegészítő PSII hatásfokon alapszik. A gerjesztési energia hasznosulhat a fotokémia

által ( $\Phi_{PSII}$ ), illetve eliminálódhat a regulált hődisszipáció ( $\Phi_{NPQ}$ ) és a nem-regulált (konstitutív) energia disszipáció ( $\Phi_{NO}$ ) során a PSII-ben. A 10. ábrán láthatók a  $\Phi_{PSII}$ ,  $\Phi_{NPQ}$  és  $\Phi_{NO}$  fényintenzitás függéseinek összehasonlítása a *S. nigrum* vonalakban (10. a, c és e ábrák); valamint a fotokémiában hasznosuló elektronok transzportjának sebessége ( $J_{ETR}$ ), a regulált ( $J_{NPQ}$ ) és a nem-regulált disszipációs folyamatok sebességei ( $J_{NO}$ ) (10. b, d és f ábrák), amelyek a leveleken meghatározott  $F_m$ ,  $F'_m$  és  $F$  fluoreszcencia paraméterekből számolhatók. A  $\Phi_{PSII}$  értékei közel azonos sebességgel csökkentek a kétféle biotípusban a fényintenzitás növekedésével, azonban az AR következetesen alacsonyabb értékeket vett fel (10. a ábra) (ahogy ezt már az 5. a és 9. ábrákon is szemléltettem), mialatt a  $J_{ETR}$  növekedési üteme az AR típusokban hangsúlyosabban lecsökkent (10. b és 5. b ábrák). A  $\Phi_{NPQ}$  és  $J_{NPQ}$  (10. c és d ábrák) aktinikus fényre adott válaszgörbéi az AS és AR szülő biotípusokban, valamint a hibridjeikben is megegyeztek. Alacsony fényintenzitásokon a  $J_{NPQ}$  igen alacsony volt, majd exponenciálisan emelkedett a fényintenzitással mindkét biotípusban (10. d ábra). A  $\Phi_{NO}$  értékeiben szignifikáns emelkedést (kb. 60-80%) tapasztaltunk az AR vonalakban az AS párjaikkal összevetve ( $p=0,001$ ) (10. e ábra), ami enyhén emelkedett a fényintenzitással. Az AS növényekben a  $\Phi_{NO}$  értékek a sötétadaptált mintákra jellemző  $F_o/F_m$  értékeket közelítették, és a fényintenzitás emelkedése gyakorlatilag nem befolyásolta a hatásfokot. A konstitutív energia disszipáció sebességei ( $J_{NO}$ ) mindkét típusban lineárisan emelkedtek, az emelkedés az AR típusokban szignifikánsan meredekebb volt (10. f ábra).

Az NPQ kialakulásában a PsbS fehérjének kulcsfontosságú szerepet tulajdonítanak. Felmerült, hogy egy esetleges pontmutáció a *psbS* génben részben magyarázhatná az AR biotípus alacsonyabb fény-indukált NPQ kapacitását, ezért meghatároztuk a *S. nigrum* AS és AR biotípusainak *psbS* génszekvenciáját annak érdekében, hogy felfedjük a PsbS fehérje esetleges aminosav változásait. A *psbS* génre specifikus primer párokat (primerek Pr-SniF1, Pr-SniR1, Pr-SniF2, Pr-SniR2 és Pr-SniStop-F1, Pr-SniStop-R1, lásd: Anyag és Módszer fejezet 2. táblázata) terveztünk és szintetizáltattunk a *S. nigrum* egy közeli rokona, a *S. sogarandinum* *PsbS* cDNS szekvenciájának (Gén Bank nyilvántartási szám: AF311720) ismert nukleotid sorrendje alapján. Az AS és AR biotípusokban a teljes hosszúságú *psbS* gén szekvenciájában négy nukleotidot érintő különbséget kaptunk. Ezek közül kettő intronokban lokalizált, a másik két változás, a két érintett kodon harmadik pozíciójában található, amelyek

nem változtatják meg az aminosav kódot: GGT→GGC mindkettő glicint kódol és ACC→ACT mindkettő treonint kódol.



**10. ábra** A PSII komplementer hatásfokainak (Hendrickson et al., 2004) és e folyamatok sebességeinek fényintenzitás függése AS (üres szimbólum) és AR (teli szimbólum) *S. nigrum* biotípusok leveleiben, és hibridjeikben. AS és AR, szülő,  $\square$  és  $\blacksquare$ ; ASF2 és ARF2,  $\circ$  és  $\bullet$ ; ASF6 és ARF6,  $\triangle$  és  $\blacktriangle$ . Grafikonok: (a, b) a fotokémiai energia konverzió hatásfoka  $\Phi_{\text{PSII}}$ ; (c, d) a regulált energia disszipáció hatásfoka  $\Phi_{\text{NPQ}}$ ; (e, f) a nem-regulált energia disszipáció hatásfoka  $\Phi_{\text{NO}}$ .  $J_{\text{ETR}}$ ,  $J_{\text{NPQ}}$ ,  $J_{\text{NO}}$ , rendre a lineáris elektrontranszport, a regulált hődisszipáció és a nem-regulált energia disszipáció sebességeit jelölik. Az adatok három független kísérletből 12 ismétlés átlagai. A SD a szülő (AS és AR) populációkban van feltüntetve.

Tehát a szekvencia analízis alapján a *S. nigrum* növény AS (Gén Bank nyilvántartási szám: DQ632747) és AR (Gén Bank nyilvántartási szám: DQ632748) biotípusaiban azonosak a PsbS fehérjék, azaz nem tartalmaznak aminosav eltérést (11. ábra). A *S. nigrum* biotípusok DNS szekvenciájából levezetett aminosav szekvencia nagyfokú homológiát mutat a Genebank-ban (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) megtalálható egyéb PsbS fehérje szekvenciákkal.

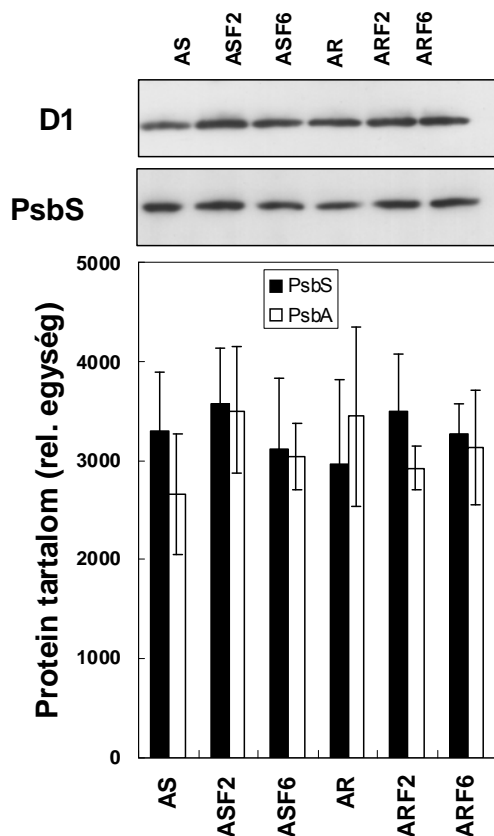
```

1                               38
MAQTMLL---TANAKVDLRSKESLVERLKPPLSSLFLPSLPLRFSSST
39           ↓                               85
NASSSKFTSTTVALF-KSKAK-APPKKVAPPKQKEKVEDGIFGTSGGIGF
86                               *               *   *   *   135
TKQNELFVGRVAMIGFAASLLGEAITGKGILAQLNLETGIPIYEAPELLL
136                               183
FFILFNLLGAIGALGDRGRFIDDPAPATGLEKAVIPPGKSFKSALGLSEG
184                               *               *   232*
GPLFGFTKANELFVGRLAQLGIAFSIIGEIIITGKGALAQLNFETGVPINE
234*                               265
IEPLLLFNIAFFFFFAAINPGTGKFITDEED*.....

```

**11. ábra** A *S. nigrum* PsbS fehérjéjének várható aminosav szekvenciája. A számozás az *A. thaliana* szekvenciáján alapul. A hasítási helyet, ahol a fehérjét elvágtuk a kloroplasztisz targeting alatt, nyíl jelzi. A csillagok azt a nyolc darab vélt  $H^+$ -kötő aminosavat jelölik, melyek várhatóan a tilakoid lumennel szemben helyezkednek el.

A PsbS fehérje expressziós szintje fontos tényező lehet a növény teljes NPQ kapacitásának meghatározásakor. Immunoblot módszerrel specifikus antitestek alkalmazásával megvizsgáltuk a PsbS és a D1 fehérjék expresszióját, hogy felfedjük, vajon a PsbS fehérje szerepet játszik-e az AS és AR vonalak eltérő NPQ kapacitásában (12. ábra). A PsbS és PsbA western blotjainak denzitometriai analízisén végzett student t-teszt nem mutatott szignifikáns eltérést a fehérje mennyiségében az AS és az AR vonalak között ( $p=0,05$ ). Azonfelül e két kulcsfehérje aránya gyakorlatilag változatlan maradt a biotípusokban.



**12. ábra** *S. nigrum* növény AS és AR szülő, valamint ezek reciprok keresztezéseiből származó F2 és F6 utódnövények PsbA (D1) és PsbS fehérjéinek tipikus immunoblot analízise és ezek relatív tartalma. A relatív fehérje tartalom adatai átlag  $\pm$  SD ( $n = 5-6$ ).

### 5.1.3. *A. S. nigrum* vonalak sejtmagi hibrid státuszának igazolása

Mivel a *psbA* gén citoplazmatikus, a *psbS* gén pedig sejtmagi öröklődésű, fontos azt megerősíteni, hogy az AS és az AR szülő biotípusok reciprok keresztezése sikeres volt-e. Független belső indikátorként egy mendeli tulajdonságot, a levélszél alakjának öröklődését követtük nyomon, mely bizonyítja az F2 növényi anyag sejtmagi hibrid státuszának meglétét. A levélszél tekintetében síma, csipkézett vagy köztes típust találtunk (13. ábra), amelyek különböző gyakorisággal fordultak elő a szülő populációkban (6. táblázat). Miként az F2 nemzedék levélszél típusának várható – a Hardy-Weinberg modell szerint kalkulált – szegregációja és a kísérletesen megfigyelt adatok nem különböztek szignifikánsan (7. táblázat;  $P < 0,05$ ;  $\chi^2$  teszt), biztonsággal megállapíthattuk, hogy a levélszél alakja a mendeli szabályok szerint öröklődött, mely az F2 populáció hibrid státuszának meglétét bizonyítja.



Síma, épszélű

Részlegesen  
csipkézett-hullámos

Csipkézett szélű

13. ábra *A. S. nigrum* levélszéle síma, csipkézett vagy köztes típusú volt.

6. táblázat *A. S. nigrum* szülő populáció levélszél típusai és az NPQ (vagy *qE*) karakterisztika

Szülő populáció	Levélszél típus gyakoriság			NPQ (vagy <i>qE</i> )
	síma	köztes	csipkézett	
Atrazin-szenzitív	0,67	0,11	0,22	Magas
Atrazin-rezisztens	0,01	0,11	0,88	Alacsony

*n* = 208 mindkét szülőpopuláció esetében

7. táblázat *S. nigrum* F2 populáció tulajdonságai és az NPQ (vagy *qE*) tulajdonság

Genetikai keresztezés	Eredmény	Különböző levélszél típusú növények darabszáma			Atrazinra adott válasz	NPQ (vagy <i>qE</i> )
		síma	köztes	csipkézett		
szenzitív ♀♀ × rezisztens ♂♂	Megfigyelt	13	31	41	Mind szenzitív	Magas
	Várható*	14	22	49		
rezisztens ♀♀ × szenzitív ♂♂	Megfigyelt	22	52	68	Mind rezisztens	Alacsony
	Várható*	14	53	75		

\*A szülőkből és az F1 populációban előforduló allélgyakoriságok alapján határoztuk meg

Valamennyi F1 és F2 utódnövény (F6 nemzedékig), mely AS ♀ × AR ♂ keresztezésből való volt, AS, és valamennyi utódnövény, amely AR ♀ × AS ♂ keresztezésből származott, AR biotípusú volt, amely bizonyította a kloroplasztisz-DNS által kódolt atrazin rezisztencia anyai öröklődését. Az alacsonyabb NPQ (vagy qE) tulajdonság az anyai öröklődésű AR jelleget követte. Annak bizonyítására, hogy a D1 fehérje valóban hordozza-e az S264G mutációt az AR vonalakban, megszekvenáltuk a fehérjének a mutációt is kódoló DNS szakaszát. Valamennyi megszekvenált rezisztens vonal AR, ARF2 és ARF6 D1 fehérjéje hordozta a mutációt, mely a Ser<sub>264</sub>→Gly aminosav cseréért felelős, míg a szenzitív vonalakban (AS, ASF2, ASF6) ugyanabban a pozícióban szerin volt kódolva. A reciprok keresztezések ASF6 és ARF6 generációjával folytatott kísérletek igazolták, hogy a D1 mutáns biotípusban megfigyelt fluoreszcencia paraméterek különbségeit, beleértve az NPQ-t is, a kloroplasztisz genom határozza meg.

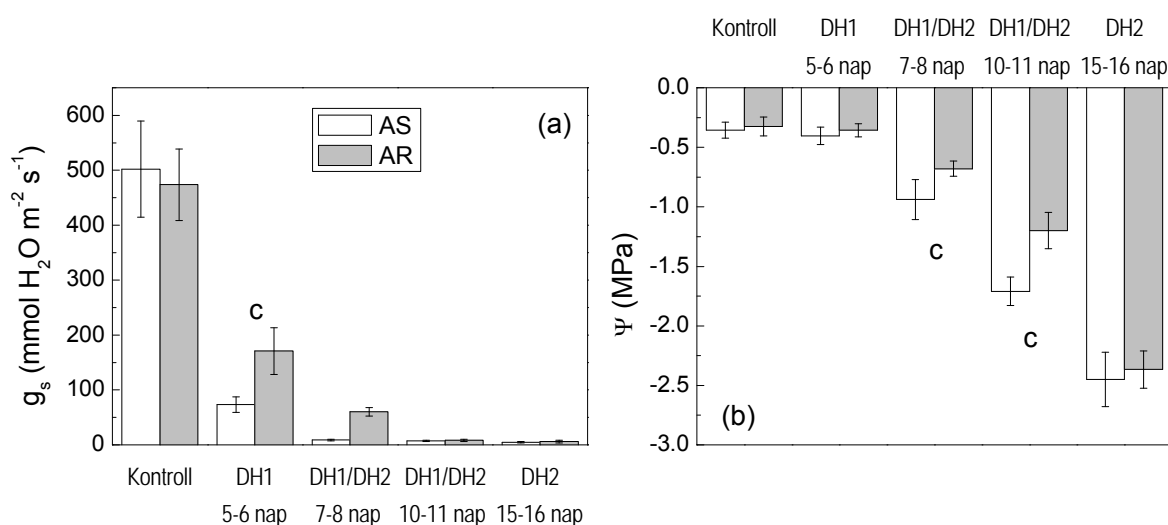
## 5.2. A vízdeficit hatásának összehasonlító vizsgálata *S. nigrum* kétféle biotípusában és a különböző növénynemzedékekben

### 5.2.1. A vízdeficit hatása a növények vízállapotára és a gázcseréjére

A továbbiakban a vízhiány (szárazság) fotoszintézisre gyakorolt hatásának összehasonlítását mutatom be *S. nigrum* AS és AR biotípusaiban. A szárazság napjainkban igen fontos környezeti tényezővé vált, amely a növekedés gátlását eredményezi a fotoszintézis limitálása révén. A vetés utáni kb. 40-42. napon, amikor a növényeket jó vízellátású kontroll állapotúnak definiáltuk, egy részüktől megvontuk az öntözést. A növények vízállapotát és gázcseréjét jellemző paraméterek alapján három szakaszt különítettünk el a vízhiány időbeni vizsgálata során: enyhe szárazság (5-7 nap vízmegvonást követően), közepes szárazság (13-15 nap), és erős szárazság (18-19 nap), melyeket DH1 (dehydration state 1), DH2 (dehydration state 2), és DH3 (dehydration state 3) jelöléssel illettük. A vízmegvonás különböző szakaszaiban a növények egy részét a rehidráció után tovább vizsgáltuk, és RH1, RH2 vagy RH3 (rehydration state 1, 2 és 3) jelöléssel illettük (lásd: Anyag és Módszer fejezet).

A sztómasűrűség a levél abaxiális felületén kissé különbözött a jó vízellátású kontroll AS és AR szülő biotípusokban ( $28 \pm 4 \text{ mm}^{-2}$  és  $20 \pm 4 \text{ mm}^{-2}$ ). A progresszív vízdeficit hatására a sztóma vezetőképesség ( $g_s$ ), a levél vízpotenciál ( $\Psi$ ) és a levél relatív víztartalom (RWC) értékei csökkentek (14. a, b ábrák és 8. táblázat). A  $g_s$  és a  $\Psi$  paraméterek értékei (kb.  $490 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  és  $-0,34 \text{ MPa}$ ) közel azonosak voltak a kontroll biotípusokban (14. a és b. ábrák), és az RWC (kb. 91%) szintén nem különbözött az AS és AR növényekben (8. táblázat). A vízmegvonást követő ötödik napon (DH1) erőteljes sztóma konduktancia csökkenés mutatkozott mindkét biotípusban (14. a ábra). A sztómazáródás mértéke szignifikánsan nagyobbak bizonyult az AS, mint az AR típusban (14. a ábra), miközben az RWC (kb. 90%) és a  $\Psi$  ( $-0,38 \text{ MPa}$ ) értékekben még nem mutatkozott változás a kontrollokhöz képest (8. táblázat és 14. b ábra). Majd a vízhiány további szakaszában a drasztikus  $g_s$  csökkenést a  $\Psi$  csökkenése is követte. Azonban az AR típusban a  $g_s$  és  $\Psi$  csökkenése lassabban és kevésbé kifejezetten valósult meg, mint az AS párjában. A vízdeficit DH2 (13-15 nap) szakaszában az RWC értékeiben jelentős visszaesés történt, mely hasonló mértékű volt (60-80%) a kétféle biotípusban, a  $g_s$  értékek mindkét biotípusban a nullát közelítették, a  $\Psi$  értékei pedig elérték a

-2,5 MPa-t. A DH3 szakaszban a levelek fonnyadtsága miatt a vízpotenciál mérése már nem volt kivitelezhető, a  $g_s$  értéke nulla volt, a RWC értékei a kétféle biotípusban hasonló mértékben 30-55%-ra csökkentek (8. táblázat).



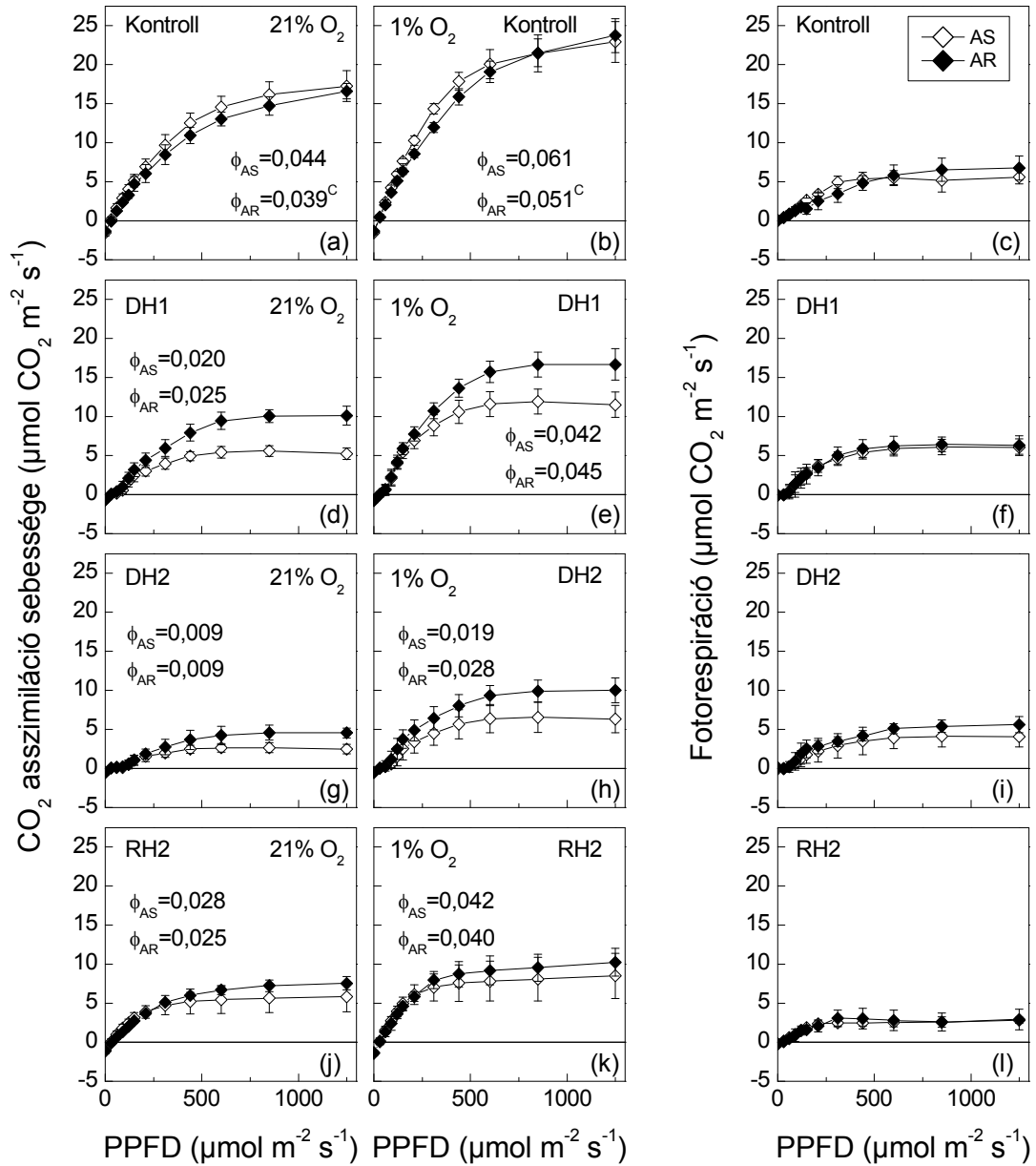
**14. ábra** A vízmegvonás hatása a sztóma konduktanciára ( $g_s$ ) (a) és a levél vízpotenciáljára ( $\Psi$ ) (b) *S. nigrum* AS (üres oszlop) és AR (teli oszlop) biotípusaiban. Az adatok három független kísérletből 9-11 ismétlés átlagai  $\pm$  SD. A “c” szignifikáns eltérést jelöli a két biotípus között 5%-os tévedési valószínűségi szinten.

**8. táblázat** A relatív víztartalom alakulása a *S. nigrum* AS és AR biotípusában

Relatív víztartalom alakulása a vízhiány hatására (%)				
Biotípus	Kontroll	DH1 (5-7 nap)	DH2 (13-15 nap)	DH3 (18-19 nap)
AS	91,6 $\pm$ 1,8	89,0 $\pm$ 2,3	60-80	30-55
AR	91,4 $\pm$ 1,3	90,1 $\pm$ 2,4	60-80	30-55

A napok a vízmegvonás időtartamát jelölik a vízhiány egyes szakaszaiban

A szárazság elsődleges célpontjai közé tartozik a fotoszintézis. A 15. ábrán jó vízellátású kontroll, vízhiányos (DH1 és DH2) és rehidratált (RH2) *S. nigrum* növények intakt levelein meghatározott CO<sub>2</sub> asszimiláció (A) fényintenzitás függését láthatjuk. A méréseket fotorespirációs és nem-fotorespirációs körülmények között végeztük (360 μmol CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup>, és 21% illetve 1% v/v O<sub>2</sub>). A két, jó vízellátású kontroll AS és AR szülő biotípusban nem tapasztaltunk szignifikáns eltéréseket a maximális asszimilációs rátákban (A<sub>max</sub>) még nem-fotorespirációs körülmények között sem (15. a és b ábrák). A kétféle biotípus fénylégzésének sebessége (15. c ábra), mely az 1% és 21% O<sub>2</sub> tartalmú levegőben meghatározott asszimilációs ráták különbségéből számolható, sem tért el szignifikánsan egymástól. A vízhiány a sztómák záródásához vezet (14. a ábra), ami a CO<sub>2</sub> fixáció mértékének csökkenését eredményezte mindkét biotípusban (15. d és e ábrák). Az AR növény fotoszintézisének intenzitása a DH1 szakaszban magasabbnak bizonyult (15. d és e ábrák) a fényintenzitás növekedésével, mint az AS párjáé. A fénylégzés intenzitásának fényteltési értékei közel azonosak maradtak a kontrollokéhoz képest (15. f ábra), tehát a fénylégzés mértéke a kisebb CO<sub>2</sub> megkötés sebessége mellett megemelkedett. A közepes fokú szárazság esetén (DH2) a CO<sub>2</sub> asszimiláció intenzitásában további esést figyelhattunk meg mindkét biotípusban (15. g és h ábrák), és az AR továbbra is némileg felülmúlja a vad AS típust. A fotorespiráció abszolút értékeiben csökkenést tapasztaltunk mindkét biotípusban (kontrollok és DH1-hez képest 15. i ábra). A vízhiány harmadik szakaszában (DH3) mérhető sztóma konduktancia és CO<sub>2</sub> asszimiláció már nem volt észlelhető. A vízhiány egyes szakaszaiban a növények egy részét rehidratáltuk, és 24 óra elteltével azt tapasztaltuk, hogy a CO<sub>2</sub> fixálás sebessége enyhén növekedett, illetve részlegesen visszaállt (15. j és k ábrák, RH2). A növények fotorespirációjának számított sebességei az RH2 állapotú növényekben alacsonyabbak voltak mind a DH2, mind a kontrollokhoz képest, és közel azonos értékeket vettek fel a kétféle rehidratált biotípusban (15. l ábra). Mialatt a fotorespiráció intenzitásának abszolút értékei a vízmegvonás hatására csökkentek a kontrollokéhoz képest, a fotorespiráció mértéke, vagyis a Rubisco enzim által katalizált oxigenáció a karboxilációhoz viszonyítva megemelkedett.

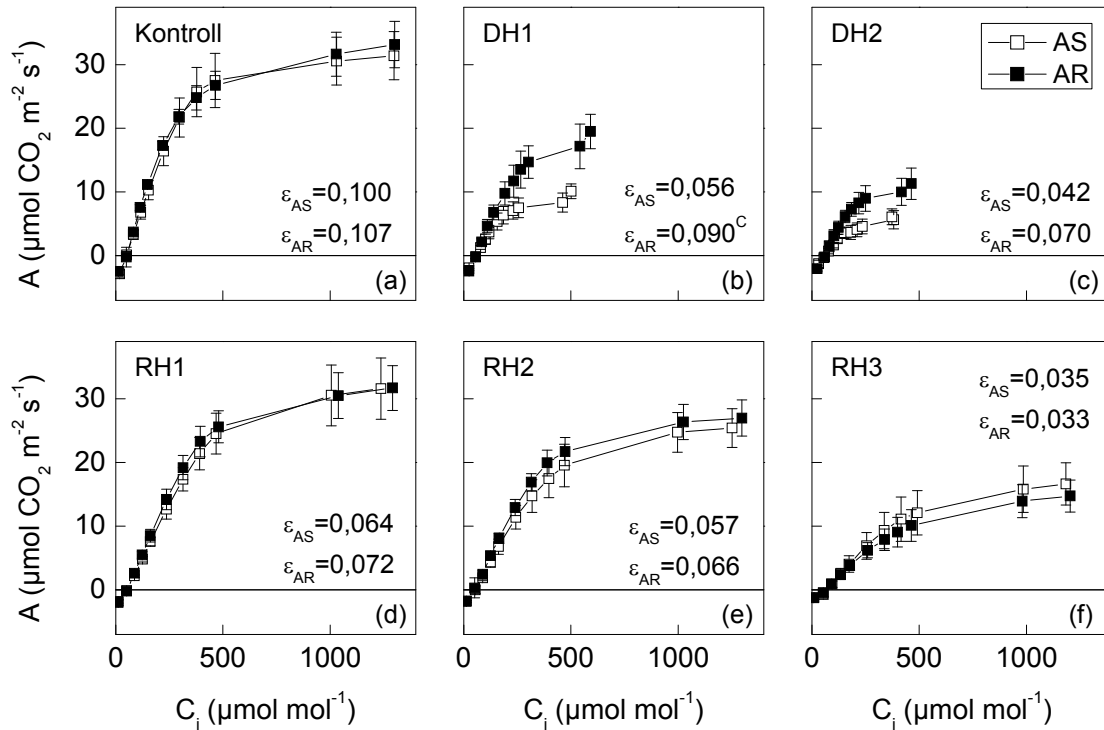


**15. ábra** A CO<sub>2</sub> asszimiláció (A) és a fénylégzés sebességének fényintenzitás függése progresszív vízmegvonás és rehidráció alatt 360 μmol CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> koncentráció mellett és 25–28°C hőmérsékleten. a, d, g, j, 21% v/v O<sub>2</sub>; b, e, h, k, 1% v/v O<sub>2</sub>; c, f, i, l, fotorespiráció számított értékei (A<sub>1%</sub> - A<sub>21%</sub>), AS, a *S. nigrum* vad biotípusa (üres szimbólum); AR, a *S. nigrum* D1 mutáns biotípusa (teli szimbólum). Kontroll: jó vízellátású; DH1: enyhe szárazság; DH2, közepes szárazság; RH2: rehidratált DH2-ből. φ, a fotoszintézis relatív hatásfoka, a görbe lineáris szakaszának kezdeti meredekségéből számolva. Az adatok három független kísérletből 5-7 ismétlés átlagai ± SD. A "c" szignifikáns eltérést jelöli a két biotípus között 5%-os tévedési valószínűségi szinten.

Míg a kontroll és a rehidratált növényekben a fotorespiráció mértéke kb. 26-31%-os volt mindkét biotípusban, addig a DH1 és DH2 szakaszokban jelentősen magasabb értékeket kaptunk, ez rendre kb. 53% és 38%-nak adódott az AS és AR típusokban gyenge vízhiány esetén (DH1), illetve 62% és 55%-nak a DH2 szakaszban.

A kontroll AR típusban a látszólagos kvantumhatásfok ( $\phi$ ), vagyis a görbe kezdeti meredeksége (kb. 15%-kal) alacsonyabb volt, mint az AS párjában (15. a és b ábrák). A vízhiány alatt (DH1 és DH2) a  $\phi$  csökkenését figyelhettük meg mindkét biotípusban (15. d, e, g és h ábrák). Nem-fotorespirációs feltételek mellett az AR magasabb hatásfokkal bírt (15. e és h ábrák), mint az AS párja, míg fotorespirációs körülmények között ezek közel azonosak voltak (15. d és g ábrák) a kétféle biotípusban a DH1 és a DH2 szakaszokban. A növények rehidratálása után 24 órával a hatásfokok jelentősen megemelkedtek a vízhiányos állapothoz képest, és hasonló értékeket vettek fel a kétféle biotípusban (15. j és k ábrák).

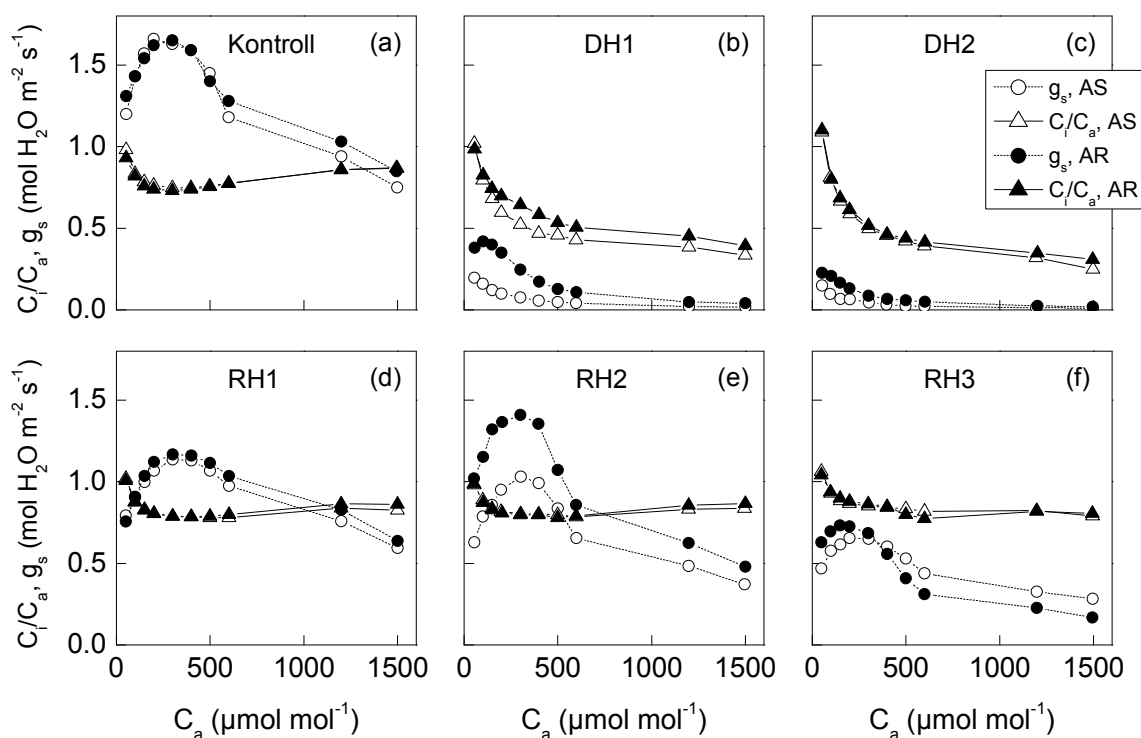
A sejtek közötti, intercelluláris  $\text{CO}_2$  koncentráció ( $C_i$ ) függvényében meghatározott  $\text{CO}_2$  asszimiláció ( $A/C_i$  görbe) hasznos indikátor lehet a vízhiány fotoszintézisre gyakorolt hatásának tanulmányozásában. A  $800 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  levélfelületre beeső fényintenzitás mellett meghatározott  $A/C_i$  görbék azonosak voltak az AS és az AR szülő biotípusokban (16. a ábra). Az  $A/C_i$  görbe kezdeti meredeksége ( $\epsilon$ ), mely a Rubisco enzim aktivitására és/vagy extrahálható mennyiségére jellemző érték (karboxilációs hatékonyság), megegyezett a kétféle kontroll biotípusban (16. a ábra). A vízhiány (DH1 és DH2) az  $\epsilon$  értékeket negatívan befolyásolta, azonban az AR esetében jelentősen kisebb mértékű csökkenés mutatkozott, mint az AS párjában (16. b és c ábrák). Az  $A/C_i$  görbe kezdeti szakaszát követően, a magasabb  $C_i$  értékeknél a RuBP regenerációjának sebessége ( $J_{\max}$ ) és az inorganikus foszfát ( $P_i$ ) elérhetősége válik az asszimiláció sebességének meghatározójává. A progresszív vízhiány mindkét biotípusban szignifikánsan csökkentette a RuBP regenerációjának sebességét (16. b és c ábrák). Az adatok további analízise során megvizsgáltuk a vízhiány hatását a látszólagos karboxilációs hatásfok ( $C_i/C_a$ ) és a sztóma konduktancia ( $g_s$ ) értékeire légköri  $\text{CO}_2$  koncentráció ( $C_a$ ) függvényében (17. ábra). A  $C_i/C_a$  és a  $g_s$  a kétféle kontroll biotípusban nem különböztek (17. a ábra). A  $g_s$  tranziensen emelkedett kb.  $300 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$  koncentrációig majd egy gyors csökkenés ( $600 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$  koncentrációig) után egy lassabb csökkenés következett a legmagasabb  $C_a$  értékig (17. a ábra,  $g_s$ ). A  $C_i/C_a$  arány egy enyhe visszaesés után felvette a kb. 0,75 értéket, mely közel állandó maradt mindkét biotípusban (17. a ábra).



**16. ábra** A CO<sub>2</sub> asszimilációs ráta ( $A$ ) az intercelluláris CO<sub>2</sub> koncentráció ( $C_i$ ) függvényében. AS, a *S. nigrum* vad biotípusa (—□—); AR, a *S. nigrum* D1 protein mutáns biotípusa (—■—). Kontroll: jó vízellátású; DH1: enyhe szárazság; DH2, közepes szárazság; RH1, RH2 és RH3: rehidratált növény a DH1, DH2 és DH3 szakaszból. A méréseket LCpro+ IRGA készülékkel végeztük, a levélfelületen a beeső fényintenzitás  $800 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , a levélkamra hőmérséklete  $25\text{--}28^\circ\text{C}$  volt.  $\epsilon$ , a Rubisco enzim aktivitása és/vagy extrahálható mennyisége, mely a görbe lineáris szakaszának kezdeti meredeksége. Az adatok három független kísérletből 5-7 ismételés átlagai  $\pm$  SD. A “c” szignifikáns eltérést jelöli a kétféle biotípus között 5%-os tévedési valószínűségi szinten.

A vízhiány a sztómazáródás inicializálása által csökkentette a sztóma vezetőképességet, így a  $C_i/C_a$  arányt is (17. b és c ábrák). Enyhe vízhiány esetén (17. b ábra, DH1) a biotípusok közötti különbség jól észlelhető az AR típus javára. Az idő előrehaladtával (17. c ábra, DH2) a csökkenés folytatódott, és a kétféle biotípus között fennálló különbség mérséklődött illetve el

is tűnt. A növényeknek a szárazság különböző szakaszaiból történő rehidratálása (RH1, RH2 és RH3) után a helyreállási folyamatoknak köszönhetően mindkét biotípusban emelkedni kezdett a CO<sub>2</sub> asszimiláció intenzitása, azonban csak részleges helyreállást tapasztaltunk a J<sub>max</sub> értékében a magas intercelluláris CO<sub>2</sub> koncentrációknál (16. d, e és f ábrák). A 17. d, e és f ábrák azt mutatják, hogy a C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub> arány csaknem teljesen helyreállt, és elérte a kontroll növényekre jellemző értékeket mindkét biotípusban, a g<sub>s</sub> helyreállása azonban csak részlegesen valósult meg.



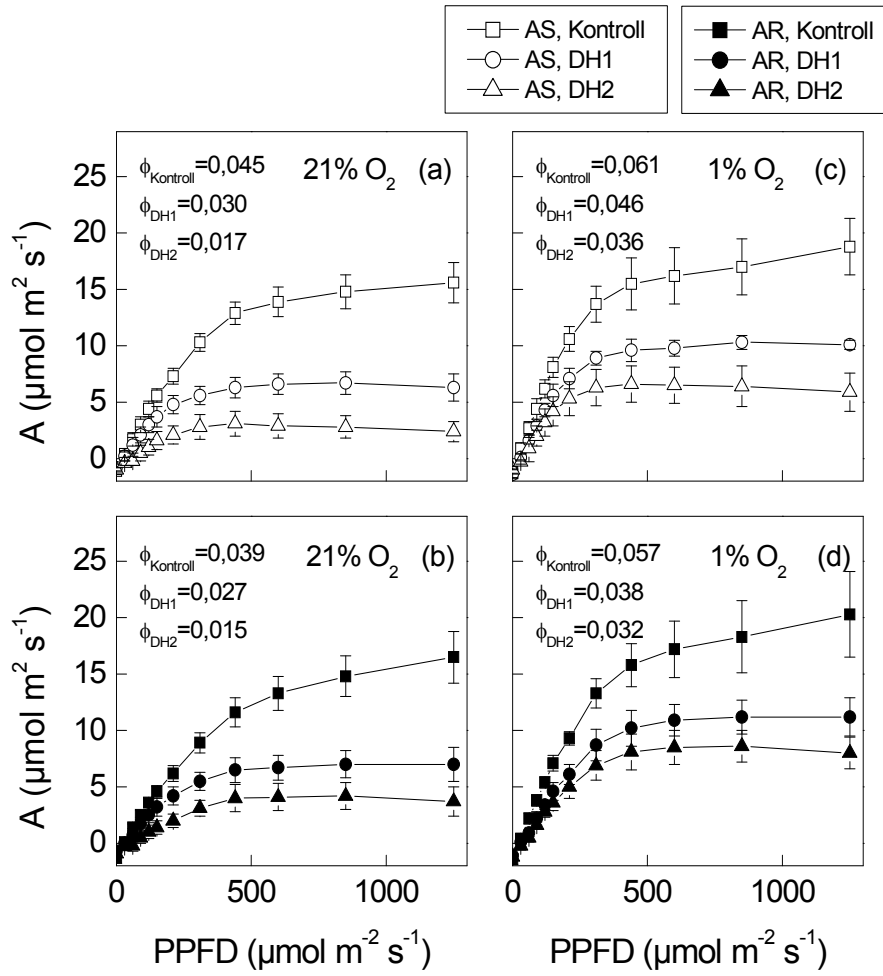
**17. ábra** A látszólagos karboxilációs hatások ( $C_i/C_a$ ,  $\triangle$  és  $\blacktriangle$ , az AS és az AR biotípusokban) és a sztóma konduktancia ( $g_s$ ,  $\circ$  és  $\bullet$ , az AS és az AR biotípusokban) válaszgörbéi a légköri CO<sub>2</sub> koncentráció ( $C_a$ ) függvényében *S. nigrum* leveleiben. Kontroll: jó vízellátású; DH1: enyhe szárazság; DH2, közepes szárazság; RH1, RH2 és RH3: rehidratált növény a DH1, DH2 és DH3 szakaszból. A méréseket LCpro+ IRGA készülékkel végeztük, a levélfelületen a beeső fényintenzitás  $800 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , a levélkamra hőmérséklete  $25\text{--}28^\circ\text{C}$ . Az adatok három független kísérletből 5-7 ismétlés átlagai.

Választ kerestünk arra, hogy a *S. nigrum* szülő AR biotípusának a vízállapot és a gázcseré szempontjából mutatott toleránsabb viselkedése a vízhiánnyal szemben a D1 fehérje mutációjához köthető-e, ezért vizsgálatokat folytattunk a reciprok keresztezésekből származó hibrid növényekkel is. A gázcseré vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy a szülő biotípusok közötti, a vízhiány alatt fennálló különbség eltűnt az F2 hibridek AS és AR típusai között (ASF2 és ARF2). Mind a fotoszintetikusan aktív fényre adott válaszgörbék (18. ábra), mind az A/C<sub>i</sub> görbék esetében (9. táblázat) az ASF2 és ARF2 jó vízellátású kontrollok értékei szinte azonosak voltak a szülőkéivel. A vízhiány (DH1 és DH2) által indukált csökkenés szinte azonos mértékű volt az F2 hibridek kétféle biotípusában, mely értékek a vízhiánynak kitett AR szülő értékeit közelítették. Az adatok további analízise során a g<sub>s</sub> és a C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub> paraméterek is azt mutatták, hogy a kétféle szülő biotípusban tapasztalt különbségek elmosódtak az F2 nemzedékben (adatok nincsenek bemutatva). Ugyanezt a megállapítást tehetjük a sztómasűrűség vizsgálatokkal kapcsolatban is ( $24 \pm 8 \text{ mm}^{-2}$  és  $25 \pm 7 \text{ mm}^{-2}$  az ASF2 és ARF2-ben).

**9. táblázat** A *S. nigrum* szülő és F2 hibridek  $J_{\max}$  értékeinek összehasonlítása

Biotípus	Kezelés	$J_{\max}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$J_{\max}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Kezelés	Biotípus
AS	Kontroll	$31,40 \pm 3,77$	$29,59 \pm 4,07$	Kontroll	ASF2
	DH1	$10,11 \pm 1,16$	$18,91 \pm 2,31$	DH1	
	DH2	$6,10 \pm 1,24$	$11,30 \pm 1,81$	DH2	
	RH1	$31,61 \pm 4,82$	$30,98 \pm 3,67$	RH1	
	RH2	$25,41 \pm 3,04$	$22,17 \pm 2,79$	RH2	
	RH3	$16,64 \pm 3,32$	$16,12 \pm 2,07$	RH3	
AR	Kontroll	$33,15 \pm 3,77$	$29,36 \pm 3,58$	Kontroll	ARF2
	DH1	$19,51 \pm 2,70^b$	$19,94 \pm 3,94$	DH1	
	DH2	$11,31 \pm 2,47^c$	$10,54 \pm 1,91$	DH2	
	RH1	$31,74 \pm 3,50$	$31,55 \pm 2,71$	RH1	
	RH2	$26,98 \pm 2,84$	$21,65 \pm 1,49$	RH2	
	RH3	$14,75 \pm 2,51$	$15,04 \pm 1,89$	RH3	

AS és AR, ASF2 és ARF2 a *S. nigrum* szülő vad és D1 mutáns, F2 nemzedék vad és D1 mutáns biotípusai. A szülő AS és AR adatok a 16. ábra adataiból származnak. A kezelések, mérési körülmények, mérési eljárás ugyanazok, mint a 16. ábrán. A “b és c” szignifikáns eltérést jelölik a két biotípus között 1 és 5%-os tévedési valószínűségi szinten

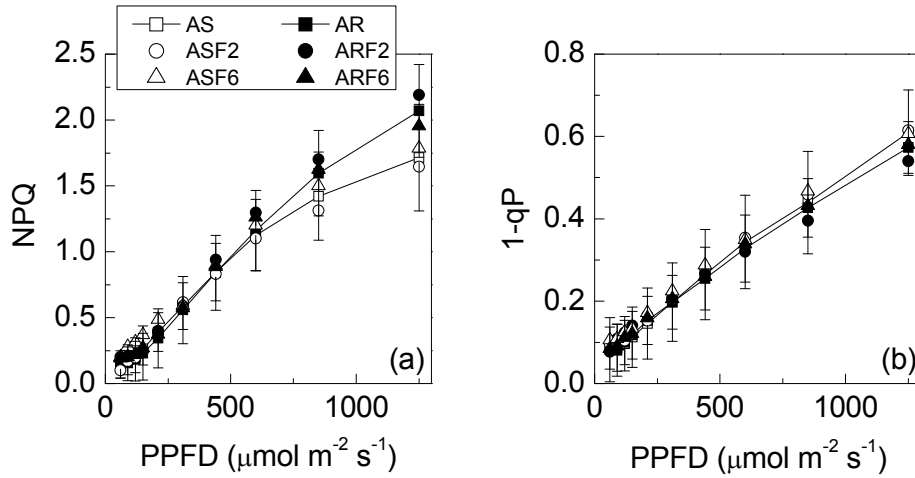


**18. ábra** A CO<sub>2</sub> asszimilációs ráta (*A*) aktinikus fényre adott válaszgörbéi progresszív vízhiány alatt. a és b, 21% v/v O<sub>2</sub>; c és d, 1% v/v O<sub>2</sub>; 360  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  koncentráció mellett és 25-28°C hőmérsékleten. ASF2, a *S. nigrum* vad-biotípusú F2 hibridje (üres szimbólum); ARF2, a *S. nigrum* D1 protein mutáns biotípusú F2 hibridje (teli szimbólum). Jó vízellátású kontroll, —□— és —■—; DH1: enyhe szárazság, —○— és —●—; DH2, közepes szárazság, —△— és —▲—.  $\phi$ , látszólagos kvantumhatásfok, a görbe lineáris szakaszának kezdeti meredeksége. Az adatok 5-7 ismételés átlagai  $\pm$  SD.

### 5.2.2. A vízdeficit hatása az elnyelt fényenergia fotokémiai hasznosítására

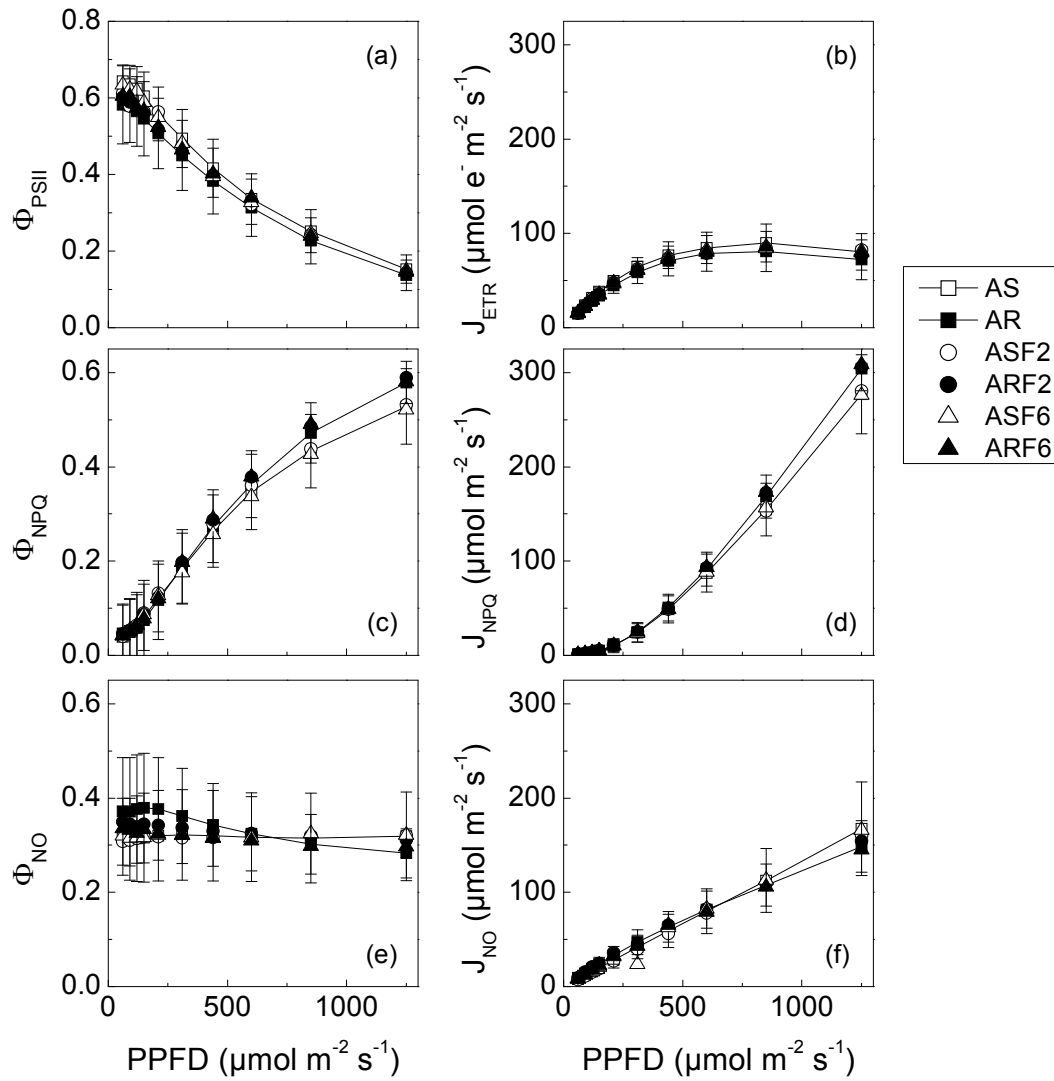
A gyenge (DH1) illetve a közepes (DH2) vízhiány szakaszaiban a PSII-re jellemző funkcionális fluoreszcencia kioltási paraméterekben nem tapasztaltunk változást a jó vízellátású kontrollokhoz képest. Változások az erős szárazságnak (DH3) kitett növények esetében léptek fel először.

Az erős vízhiány (DH3) hatására mind az NPQ mind az  $1 - qP$  megemelkedtek a jó vízellátású kontrolljaikhoz képest valamennyi növényvonalban (19. a, b, és 8. a, 5. c ábrák). Az NPQ a kétféle vízhiányos biotípusban azonos sebességgel nőtt a fényintenzitás növekedésével, az AR vonalak (AR, ARF2, ARF6) közel telítési fényintenzitáson enyhén felülmúlták AS párjaikat (AS, ASF2, ASF6) (19. a ábra). A  $J_{ETR}$  és a  $\Phi_{PSII}$  aktinikus fényre adott válaszgörbéi alapján megállapíthatjuk, hogy ezek a jó vízellátású kontrolljaikhoz képest (10. a és b ábrák) az erős szárazság hatására közel azonos értékekre estek vissza a kétféle biotípusban (20. a és b ábrák). Fontos megvizsgálnunk, hogy míg a jó vízellátású kontroll AR vonalakban a  $\Phi_{PSII}$ ,  $J_{ETR}$  és NPQ (10. a, b és 8. a ábrák) szignifikánsan alacsonyabbak voltak a növekvő fényintenzitások mellett, és a PSII-re ható gerjesztési nyomás ( $1 - qP$ ) (5. c ábra) szignifikánsan magasabbnak bizonyult, mint az AS párjaikban, addig az erős szárazság következtében jelentősen megváltozott ez a kép (20. a, b és 19 a, b ábrák). Míg az alacsonyabb NPQ kapacitással rendelkező kontroll AR típusban szignifikánsan magasabb volt a PSII-re ható gerjesztési nyomás, addig ez az erős szárazság hatására közel azonos értékekre emelkedett a kétféle biotípusban és hibridjeikben a kontrollokhoz képest (19. b ábra). A vízhiány az NPQ növekedését indukálta, amely kb. 18%-os és igen drasztikus, kb. 250%-os volt közel telítési fényintenzitáson az AS és az AR vonalakban a jó vízellátású kontrolljaikhoz képest (19. a és 8. a ábrák). Tehát, míg a kontroll AR vonalak kb. 55%-kal alacsonyabb NPQ kapacitással bírtak AS párjaikkal összehasonlítva közel telítési fényintenzitáson, addig az erős szárazságnak (DH3) kitett AR vonalak esetében ez a kép megfordult, és kb. 15%-os emelkedést figyelhattunk meg az AS párjaikkal szemben. A szülő biotípus és a megfelelő hibridjei a vízhiányos mintákban sem mutattak különbségeket az általunk vizsgált paraméterek esetén.



**19. ábra** Az erős szárazság (DH3) hatása a nem-fotokémiai kioltás (NPQ, a), és a PSII-re ható gerjesztési nyomás ( $1 - qP$ , b) fényintenzitás függésére vad (AS, üres szimbólum) és D1 mutáns (AR, teli szimbólum) *S. nigrum* vonalakban. AS és AR, szülő,  $\square$  és  $\blacksquare$ ; ASF2 és ARF2,  $\circ$  és  $\bullet$ ; ASF6 és ARF6,  $\triangle$  és  $\blacktriangle$ . Az adatok 12 ismétlés átlagai, SD a szülő (AS és AR) populációban van feltüntetve.

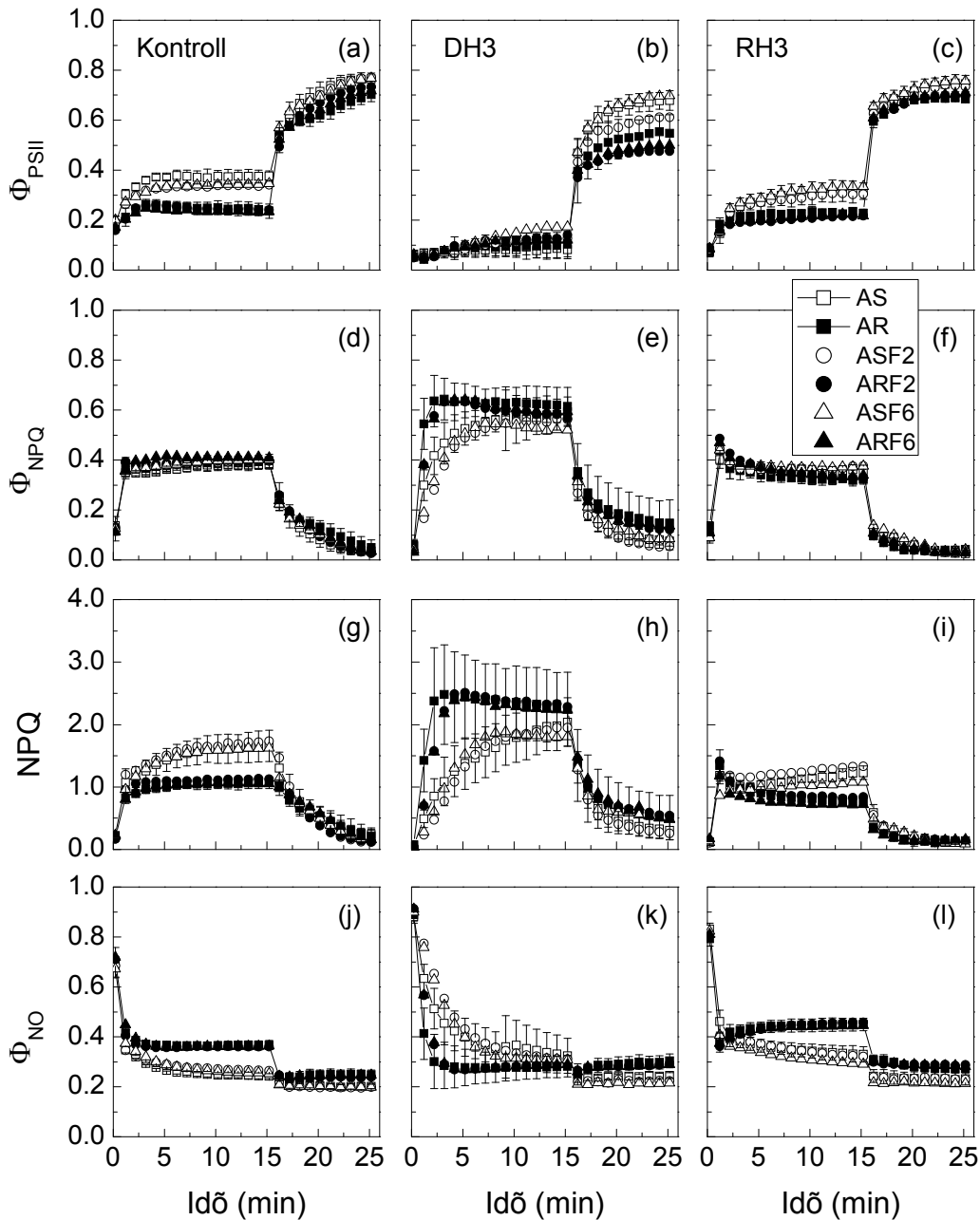
Az erősen vízhiányos (DH3) növények esetében a  $\Phi_{PSII}$  és a  $J_{ETR}$  értékei gyakorlatilag nem különböznek a kétféle szülő biotípusban és hibridjeikben (20. a és b ábrák). A regulált energiadiSSIPáció hatásfokának ( $\Phi_{NPQ}$ ) és sebességének ( $J_{NPQ}$ ) fokozódását figyelhetjük meg valamennyi vízhiányos *S. nigrum* vonalban a jó vízellátású kontrollokhoz képest (20. c, d és 10. c, d ábrák). A  $\Phi_{NPQ}$  és  $J_{NPQ}$  görbéi szinte azonosak voltak az AS és AR vonalakban. A nem-regulált hődiSSIPáció hatásfoka ( $\Phi_{NO}$ ) és sebessége ( $J_{NO}$ ) az AS vonalakban a vízhiány hatására megemelkedett a kontrollokhoz viszonyítva (20. e, f és 10. e, f ábrák). Az AR típusokban a  $\Phi_{NO}$  kismértékben növekedett a kontrollokhoz képest, azonban ezt egy csökkenő tendencia követte a fényintenzitás emelkedésével, és közel telítési fényintenzitáson a jó vízellátású kontroll értékeket közelítették. A  $J_{NO}$  a kontrollokéhoz képest szintén csökkenést mutatott az AR típusokban (20. e, f és 10. e, f ábrák). Statisztikailag nem mutatható ki szignifikáns különbség a vízhiányos AS és AR biotípusok és hibridjeik között egyik paraméter esetében sem (20. ábra).



**20. ábra** Az erős szárazság (DH3) hatása a PSII komplementer hatásfokok és sebességeik aktinikus fényre adott válasz görbéire AS (üres szimbólum) és AR (teli szimbólum) *S. nigrum* biotípusok leveleiben, és hibridjeikben. AS és AR, szülő, –□– és –■–; ASF2 és ARF2, ○ és ●; ASF6 és ARF6, △ és ▲. (a, b) fotokémiai energia konverzió  $\Phi_{\text{PSII}}$ ; (c, d) regulált energia disszipáció  $\Phi_{\text{NPQ}}$ ; (e, f) nem-regulált energia disszipáció  $\Phi_{\text{NO}}$ . Az adatok 12 ismétlés átlagai, a SD a szülő (AS és AR) populációban van feltüntetve.

Az AS és AR vonalakban a  $\Phi_{NO}$  elérte a kb. 0,3 értéket, amit a fényintenzitás emelkedése nem befolyásolt (20. e ábra). A konstitutív energia disszipáció sebességei ( $J_{NO}$ ) lineárisan emelkedtek szinte azonos sebességgel a kétféle biotípusban (20. f ábra). Összevetve a jó vízellátású kontrollok és az erős vízhiánynak (DH3) kitett növények ún. PSII komplementer hatásfokait, elmondhatjuk, hogy valamennyi vízhiányos AS biotípusban (AS, ASF2, ASF6) a fotokémiai hatásfok ( $\Phi_{PSII}$ ) kb. 60%-kal esett vissza közel telítési fényintenzitáson a jó vízellátású kontrolljaikhoz képest, azonban az AR vonalakban (AR, ARF2, ARF6) ez csupán kb. 45%-ot jelentett. A kétféle biotípus a vízhiány hatására mintegy ugyanarra a szintre csökkent, azonban a kontroll AS vonalak szignifikánsan magasabb fotokémiai hatásfokkal bírtak, mint AR párjaik. Továbbá a regulált energia disszipáció frakciója ( $\Phi_{NPQ}$ ) rendre kb. 40% és 50%-kal emelkedett meg a vízhiányos AS és AR típusokban a jó vízellátású kontrolljaikhoz képest. Eközben a nem-regulált energia disszipáció a vízhiány hatására 33%-kal nőtt az AS típusban, míg 20%-kal csökkent az AR vonalakban közel telítési fényintenzitáson.

A 21. ábra a három PSII komplementer hatásfok és az NPQ indukcióját ( $1250 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 15 perc) és sötétrelaxációját (10 perc) szemlélteti jó vízellátású kontroll, erősen vízhiányos (DH3) és rehidratált (RH3) *S. nigrum* vonalakban. Az AS és AR biotípusok között szignifikáns különbség adódott a  $\Phi_{PSII}$  értékeiben az AS vonalak javára a kontroll és a 24 órával a rehidratálás (RH3) után helyreállt növények esetében (21. a és c ábrák), míg az erős szárazságnak kitett növényekben közel azonos értékekre esik vissza a hatásfok (21. b ábra). Az NPQ és a  $\Phi_{NPQ}$  alakulásának összevetése során láthatjuk, hogy míg a kontroll és rehidratált (RH3) AR vonalak szignifikánsan alacsonyabb fotoprotektív NPQ kapacitással bírnak (21. g és i ábrák), a regulált energia disszipáció hatásfoka ( $\Phi_{NPQ}$ ), mely a fényindukált fotoprotektív folyamatokkal van összefüggésben, a kétféle biotípusban gyakorlatilag megegyezik (21. d és f ábrák, kontroll és RH3), és a sötétben teljesen relaxál.



**21. ábra** Az erős szárazság (DH3) hatása a PSII komplementer hatásfokok és az NPQ indukció ( $1250 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 15 perc) és sötétrelaxáció válasz görbéire AS (üres szimbólum) és AR (teli szimbólum) *S. nigrum* biotípusok leveleiben, és hibridjeikben. AS és AR, szülő,  $\square$  és  $\blacksquare$ ; ASF2 és ARF2,  $\circ$  és  $\bullet$ ; ASF6 és ARF6,  $\triangle$  és  $\blacktriangle$ . a, b, c – fotokémiai energia konverzió  $\Phi_{\text{PSII}}$ , rendre kontroll, DH3, RH3; d, e, f – regulált energia disszipáció  $\Phi_{\text{NPQ}}$ , rendre kontroll, DH3, RH3; g, h, i – nem fotokémia kioltás NPQ, rendre kontroll, DH3, RH3; j, k, l – nem-regulált energia disszipáció, rendre kontroll, DH3, RH3  $\Phi_{\text{NO}}$ . Az adatok 12 ismétlés átlagai, a SD a szülő (AS és AR) populációban van feltüntetve.

A vízhiány hatására jelentős NPQ növekedéssel szembesültünk mindkét biotípusban és hibridjeikben is a kontrolljaikhoz képest, azonban az AR típusokban messzemenően nagyobb növekményt tapasztaltunk, mint AS párjaikban (21. h ábra). A sötétadaptált levél megvilágítása után a vad AS típusokban az NPQ lassan kezdett emelkedni, és kb. 8 perc alatt érte el az 1,7 értéket, majd ez közel változatlan maradt a megvilágítás végéig. Az AR biotípusban az NPQ jelentősen gyorsabban alakult ki, és kb. a negyedik percben elérte a 2,5 értéket, majd enyhe csökkenés után a megvilágítás végén ez kb. 2,2-re mérséklődött. A fény kikapcsolása után az NPQ nem relaxálódott teljesen egyik biotípusban sem, statisztikailag nem mutatható ki különbség a biotípusok között. A  $\Phi_{NPQ}$  görbék alakja (21. e ábra) szorosan tükrözte az NPQ görbék menetét (21. h ábra) a vízhiányos növényekben, ami a jó vízellátású növényi anyag estében nem mondható el. A kontrollokban és a vízhiány után rehidratált növényekben (21. j és l ábrák) a  $\Phi_{NO}$ , vagyis a konstitutív energia veszteség szignifikánsan magasabb volt az AR vonalakban, azonban a vízmegvonás megfordította ezt a tendenciát. Az AR vonalakban kissé lecsökkent, míg az AS típusokban megemelkedett a  $\Phi_{NO}$ , mely különbség a megvilágítás végére mérséklődött a kétféle biotípus között, de némiképpen megmaradt az AS típus magasabb értéke (21. k ábra). Míg a vízhiányos AR vonalakban az aktinikus fény kikapcsolása nem befolyásolta a  $\Phi_{NO}$  értékét, addig az AS vonalakban ez lecsökkent, hasonlóan a kontroll és a rehidratált növények esetében.

### 5.3. Egyes nukleáris öröklődésű faktorok hatása a fotoszintetikus fényenergia hasznosításra

Csökkent NPQ kapacitással bíró *A. thaliana* mutánsokat széles körben alkalmaznak manapság az NPQ mechanizmusának tanulmányozásában. Az NPQ kialakulásának fontos tényezői közé tartoznak a nukleárisan kódolt PsbS és az LHC proteinek. *Npq* vagy *lhcb2* mutáns *S. nigrum* növényeket ez idáig nem izoláltak; D1 protein mutáns *A. thaliana* vonalhoz nem sikerült hozzájutnunk, ezért két csökkent NPQ kapacitással bíró *Arabidopsis* vonalat tanulmányoztunk, melyek nukleáris mutációt hordoztak, hogy közelebb jussunk az anyai öröklődésű D1 protein S264G mutáció és a csökkent NPQ folyamatok kapcsolatának megértéséhez a *S. nigrum* növényekben.

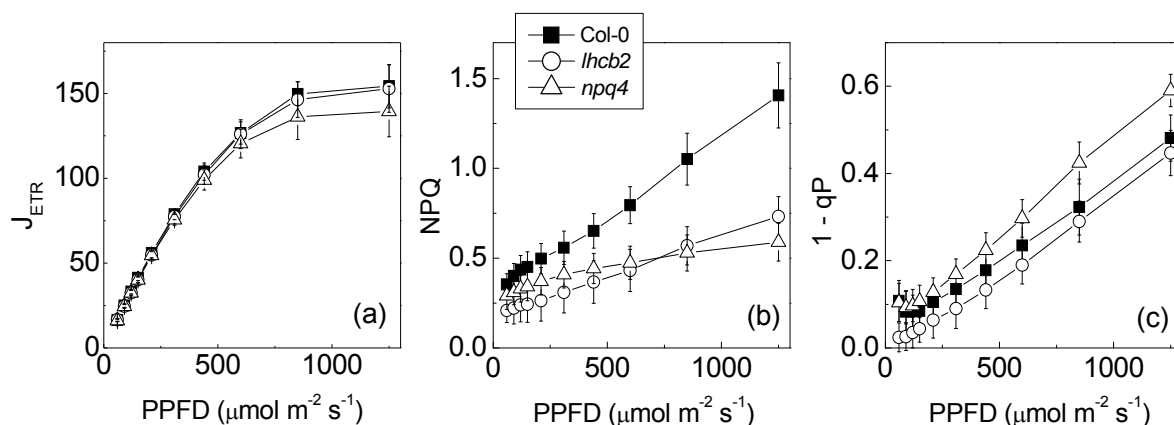
Az alkalmazott nevelési körülmények között a vad-típusú Col-0 és az *npq4* mutáns növények közel azonos Chl (*a+b*) tartalmakkal bírtak (11. táblázat), míg az *lhcb2* vonal enyhén magasabb Chl (*a+b*) tartalommal rendelkezett a vad típussal összehasonlítva. Mindkét mutáns vonalban megemelkedett a Chl *a/b* arány a vad típushoz képest, azonban az *npq4* mutánsban az emelkedés igen csekély volt.

11. táblázat Különböző *A. thaliana* vonalak pigmentösszetétele

Pigment	Arabidopsis vonalak		
	Col-0 (vad típus)	<i>lhcb2</i>	<i>npq4</i>
Chl ( <i>a+b</i> ) ( $\mu\text{mol m}^{-2}$ )	129 $\pm$ 4	143 $\pm$ 3	128 $\pm$ 3
Chl <i>a/b</i>	2,57 $\pm$ 0,1	3,16 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>	2,87 $\pm$ 0,2
Karotinoidok ( $\mu\text{mol m}^{-2}$ )	41 $\pm$ 4	43 $\pm$ 4	46 $\pm$ 5
Chl ( <i>a+b</i> )/Karotinoidok	3,2 $\pm$ 0,1	3,5 $\pm$ 0,4	2,8 $\pm$ 0,2
Vio+Ant+Zea ( $\mu\text{mol m}^{-2}$ )	12,3 $\pm$ 1,6	13,8 $\pm$ 1,5	12,5 $\pm$ 1,1
(Vio+Ant+Zea)/(Chl ( <i>a+b</i> )) ( $\mu\text{mol mmol}^{-1}$ )	93 $\pm$ 6	96 $\pm$ 2	98 $\pm$ 4
DEi	0,60 $\pm$ 0,03	0,54 $\pm$ 0,04	0,58 $\pm$ 0,03

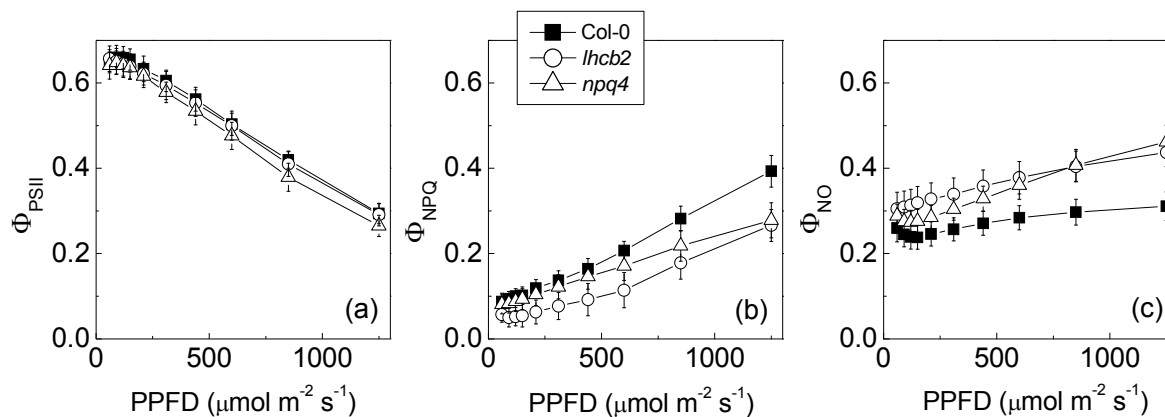
Az adatok három független kísérletből 5 ismétlés átlagai  $\pm$  SD. A "c" szignifikáns eltérést jelöli a vad típus és a mutáns vonal között 5%-os tévedési valószínűségi szinten.

Nem találtunk szignifikáns eltéréseket a három *Arabidopsis* vonal között a karotinoid összetétel, a xantofill ciklus készlet méret, vagy a xantofill ciklus készlet méret és Chl tartalom aránya tekintetében, sem a xantofill ciklus pigmentek de-epoxidációs indexében (DEi). A 22. ábrán összehasonlítom a lineáris elektrontranszport sebesség ( $J_{ETR}$ ) (a), az NPQ kapacitás (b) és a PSII-re ható gerjesztési nyomás ( $1 - qP$ ) (c) fényintenzitás függéseit a három *Arabidopsis* vonalban. A  $J_{ETR}$  és az NPQ értékei emelkedtek a növekvő fényintenzitással valamennyi *A. thaliana* vonalban, noha mindkét mutánsban az NPQ értékei alul maradtak a vad típusnak. Az *lchb2* növényekben az NPQ kissé alacsonyabb értékről indult, mint az *npq4* mutánsban, és ezek maximális értéke kb. 50%-kal volt kisebb, mint a vad típusé. A  $J_{ETR}$  fényintenzitás függése közel azonos volt a vad és az *lchb2* vonalban, azonban az *npq4* mutáns magas fényintenzitásokon kissé alacsonyabb értéket produkált. Az NPQ kapacitás és a PSII-re ható gerjesztési nyomás között, ahogy ez várható volt, fordított összefüggést kaptunk. Az *npq4* mutánsokat magasabb  $1 - qP$  érték jellemezte, így magasabb redukált  $Q_A$  koncentráció, valamennyi fényintenzitáson, a vad típushoz képest (22. c ábra). Azonban az antiszensz *lchb2* növényekben ez kissé alacsonyabbnak bizonyult, mint a vad típusban.



**22. ábra** A fotoszintetikus elektrontranszport sebesség ( $J_{ETR}$ , a), a nem-fotokémiai kioltás (NPQ, b) és a PSII-re ható gerjesztési nyomás ( $1 - qP$ , c) aktinikus fényre adott válaszgörbéi három *Arabidopsis* vonal leveleiben. Col-0, ■; *lchb2*, ○; *npq4*, △. Az adatok három független kísérletből 6 ismétlés átlagai  $\pm$  SD.

Mind az *lhcb2*, mind az *npq4* növények szignifikánsan érzékenyebbek voltak a magas fényintenzitás által indukált fénygátlásra, mint a vad típus, melyet az  $F_v/F_m$  paraméterrel jellemeztünk ( $0,805 \pm 0,066 \rightarrow 0,138 \pm 0,044$  és  $0,827 \pm 0,007 \rightarrow 0,112 \pm 0,053$  az *lhcb2* és az *npq4* vonalakban, a Col-0 vad típusban pedig  $0,832 \pm 0,007 \rightarrow 0,353 \pm 0,062$ , kontroll körülmények között mérve illetve magas fényintenzitással ( $1400 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) 4 órán keresztül megvilágítás után). A  $\Phi_{\text{PSII}}$  aktinikus fényre adott válasz görbéi alapján valamennyi *Arabidopsis* vonal közel azonos PSII hatásfokkal bírt (23. a ábra). Az *lhcb2* és az *npq4* vonalakban a  $\Phi_{\text{NPQ}}$  alacsonyabb volt, mint a vad típusban (23. b ábra). Úgy tűnik, hogy az alacsonyabb  $\Phi_{\text{NPQ}}$  értékek jól korrelálnak a csökkent NPQ kapacitással mindkét mutáns vonalban (22. b ábra). A  $\Phi_{\text{NPQ}}$  görbék alakja a két mutánsban hasonlóságot mutatott azok NPQ görbéinek alakjával (22. b és 23. b ábrák). A két mutáns vonalban a  $\Phi_{\text{NO}}$  értékei meghaladták a vad típusét valamennyi fényintenzitácson, melynek maximuma kb. 0,44 volt, míg a vad típusban csupán kb. 0,3. Ez a növekmény az alacsonyabb fotoprotektív kapacitás mintegy lehetséges kompenzációjaként szolgálhat (23. c ábra).



**23. ábra** A PSII komplementer hatásfokok aktinikus fényre adott válaszgörbéi.  $\Phi_{\text{PSII}}$ , fotokémiai energia konverzió (a);  $\Phi_{\text{NPQ}}$ , regulált energia disszipáció (b);  $\Phi_{\text{NO}}$ , nem-regulált energia disszipáció (c) három *Arabidopsis* vonal leveleiben. Col-0, ■; *lhcb2*, ○; *npq4*, △. Az adatok három független kísérletből 6 ismétlés átlagai  $\pm$  SD.

## 6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A PSII D1 RC fehérje valamennyi oxigénfejlesztő fotoszintézist folytató élő szervezetben megtalálható. Szerkezete erősen konzervált, mely azt engedi feltételezni, hogy a fehérje alapvető funkciója az evolúció során optimalizálódott. Valamennyi természetes módon kisselektálódott AR gyomfaj PSII RC-a egy szerkezetileg módosult D1 fehérjét tartalmaz, mely a plasztokinon ( $Q_B$ ) kötőhelyhez közeli Ser<sub>264</sub>→Gly aminosav cserének tudható be (Gronwald, 1994; Tian & Darmency, 2006; Trebst, 1991).

Erős napsugárzás következtében a növények az elnyelt többletenergiát nem képesek a fotoszintetikus elektrontranszporton keresztül hasznosítani. Ilyenkor a többlet gerjesztési energia termális disszipációja indukálódik, mely a PSII fotoprotekcióját hivatott biztosítani. Az NPQ a kloroplasztiszok tilakoid membránjában végbemenő folyamatok eredményeként alakul ki, többek között a tilakoid lumenének alacsony kémhatása, a PsbS és az LHC fehérjék protonációja, valamint a Zea képződése által. Az NPQ domináns, gyorsan relaxálódó frakcióját, mely a  $\Delta pH$ -tól függ, energiafüggő kioltásnak nevezik ( $qE$ ). Az ez idáig tanulmányozott D1 protein mutáns gyomfajokra a PSII működésének csökkent hatékonysága jellemző: az alacsonyabb fényindukált fotokémiai kioltás ( $qP$ ), mely fokozza a PSII-re ható gerjesztési nyomást ( $1 - qP$ ), az alacsonyabb PSII hatásfok ( $\Phi_{PSII}$ ), a lassabb elektrontranszport sebesség ( $J_{ETR}$ ) közvetlenül a D1 fehérje működésével vannak kapcsolatban. Ezek a mutánsok csökkent nem-fotokémiai kioltási kapacitással (NPQ,  $qE$ ) bírnak, melyet eddigi tudásunk alapján sejtmagban kódolt faktorok szabályoznak. A *S. nigrum* növényekben az atrazin rezisztenciát, egyetértésben korábbi munkákkal (Darkó *et al.*, 1996; 2000; Váradi *et al.*, 2003), az NPQ ( $qE$ ) kapacitás jelentős csökkenése kíséri (3. táblázat és 8. ábra) (Bajkán *et al.*, 2010). Néhány kétszikű gyomfaj AR biotípusaiban a  $J_{ETR}$  30%-kal bizonyult alacsonyabbnak, mint AS párjaikban, mely az alacsonyabb PSII fotokémiai hatásfokot tükrözi, ezenkívül 20%-kal kisebb Zea képződés és az NPQ ( $qE$ ) kapacitásban 50-70%-os csökkenés volt tapasztalható (Váradi *et al.*, 2003).

Módosult NPQ kapacitással rendelkező *Arabidopsis* mutánsokkal végzett kutatások során fény derült az alacsony NPQ néhány lehetséges okára, úgymint a PsbS fehérje hiánya vagy mutációja (Li *et al.*, 2000; 2002b; Niyogi, 1999; Peterson & Havir, 2001), az alacsony xantofill ciklus kapacitás és a Vio de-epoxidáz enzim hiánya vagy mutációja (Niyogi *et al.*,

1998; Peterson & Havir, 2000), a  $\Delta pH$  kialakulásának gátlása (Goss *et al.*, 2008; Pfündel *et al.*, 1994), vagy az LHCII antiszensz inhibíciója (Andersson *et al.*, 2001; Kovács *et al.*, 2006). A szakirodalomban elfogadott tény, hogy az NPQ függ a tilakoid lumen alacsony kémhatásától, ami események sorozatát indítja be, melyben bennefoglaltatik a pigmentösszetétel megváltozása és a PSII antenna komplexek szerkezeti újrendeződése.

A szakirodalom szerint az NPQ kialakulásában esszenciális faktorok sejtmagi gének által kódoltak (Funk *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2000; Bugos & Yamamoto, 1996; Jansson, 1999), habár a D1 fehérjét kódoló *psbA* gén a kloroplasztisz genom része. Nem világos, hogy a D1 fehérje milyen hatással van az antennában végbemenő hődisszipáció kialakulására. Ezért nem zárható ki az, hogy a *S. nigrum* és más gyomfajok (Darkó *et al.*, 1996; 2000; Váradi *et al.*, 1994; 2003) AS és AR biotípusai között tapasztalható különbség az NPQ (qE) kapacitásban a biotípusok genetikai hátterének eltéréseiből adódik, semmint a D1 fehérje mutációnak köszönhető. Hogy ezt az eshetőséget feltárjuk, reciprok keresztezéseket végeztünk a *S. nigrum* kétféle szülő biotípusa között, és az ebből származó hibridekkel (F1, F2 egészen az F6-ig) vizsgálatokat folytattunk. Azt feltételeztük, hogy ha a vad AS és a D1 mutáns AR biotípusok különböznek egymástól az NPQ-val összefüggő nukleárisan kódolt tulajdonságokban, a reciprok keresztezések a utód-generációkban az NPQ tulajdonságokat változtatni fogják. Azonban azt találtuk, hogy az NPQ kapacitásbeli különbséget nem befolyásolták a sejtmagi szabályozó faktorok a hibridekben egészen az F6 generációig (8. ábra) (Bajkán *et al.*, 2010). Ezt az a tény is támogatja, hogy a szekvencia analízis alapján a *S. nigrum* AS és AR biotípusaiban azonosak voltak a PsbS fehérjék, azaz nem tartalmaztak aminosav eltérést (11. ábra), és a PsbS és D1 fehérjék expressziójában sem találtunk különbségeket (12. ábra) (Bajkán *et al.*, 2010).

A reciprok keresztezésekből való D1 protein mutáns *S. nigrum* vonalak (AR, ARF2, ARF6) az elnyelt energiát kevésbé hatékonyan hasznosították fotokémiára ( $\Phi_{PSII}$ ), mint a vad biotípusok (AS, ASF2, ASF6) és a köztes elektron akceptorok felé irányuló elektrontranszport sebessége ( $J_{ETR}$ ) 30%-kal bizonyult alacsonyabbnak közel telítési fényintenzitáson (5. a és b ábrák) (Bajkán *et al.*, 2010). A D1 protein mutáció hátterének és lehetséges következményeinek jobb megértése végett két modellt használtunk, hogy meghatározzuk az elnyelt fényenergia megoszlását, mely egyrészt fotokémiailag hasznosulhat a PSII-ben ( $\Phi_{PSII}$ ), másrészt disszipatív folyamatok eliminálhatják regulált és nem-regulált utakon keresztül. Az

NPQ paraméter a hődisszipáció sebességével arányos, azonban nem nyújt kvantitatív információt arról, hogy mekkora energiafrakció disszipálódott el hőként a PSII antennarendszerében. Hendrickson és munkatársai (2004) modellje a fotoszintetikus energiaátvitel területén már korábban is létező, jól definiált hatásfokokon alapszik, úgymint a  $\Phi_{\text{PSII}}$  (Genty *et al.*, 1989),  $\Phi_{\text{NPQ}}$ ,  $\Phi_{\text{NO}}$  (Cailly *et al.*, 1996), illetve hatékonyan különíti el ez utolsó kettőt, a regulált és nem-regulált energia disszipációs folyamatokat; kiküszöböli az ún. többletenergia frakció problematikáját, nem úgy, mint Demmig-Adams és munkatársai (1996) modellje, mely abban különbözik az előzőtől, hogy az ő kalkulációjukban a többletenergia frakció ( $\Phi_{\text{E}}$ ) is bennefoglaltatik, mely nem hasznosul a fotokémia folyamatában és termálisan sem disszipálódik el. A PSII energia allokációjának összehasonlító analízise Demmig-Adams és munkatársai (1996) modellje alapján azt mutatta, hogy a különböző gyomfajok AS és AR biotípusaiban a fotoszintetikus energia konverzió megváltozott szabályozása a D1 protein mutációval volt összefüggésben (Váradi *et al.*, 2003). Ugyanakkor a fényadaptált AR növények alacsonyabb NPQ szintje és megnövekedett energia disszipációs kapacitása között ellentmondás tárult fel (Váradi *et al.*, 2003). A PSII fotokémiára történő energia-felhasználás ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) az aktinikus fényre adott válaszgörbék alapján szignifikánsan alacsonyabb volt a *S. nigrum* AR vonalaiban (AR, ARF2, ARF6) mint a vad típusokban (AS, ASF2, ASF6), azonban a D1 fehérje mutáció nem volt hatással a fényben disszipált hőenergia frakciójára ( $\Phi_{\text{DL}}$ ) vagy inkább kissé emelte azt, az alacsonyabb NPQ kapacitás ellenére (9. ábra). Ugyanakkor a többletenergia disszipációja ( $\Phi_{\text{E}}$ ) szintén szignifikánsan magasabb volt a *S. nigrum* D1 mutáns vonalaiban (9. ábra). Az elnyelt többletenergia másfelől reaktív oxigén formák képződéséhez vezethet az antennában és/vagy redukálhatja a molekuláris oxigént, mely potenciálisan károsíthatja a fotoszintetikus rendszert. Kato és munkatársai (2003) szerint a többletenergia frakció a PSII fotoinhibíciójának sebességi állandóját határozza meg a levelekben. Az AR vonalak alacsonyabb Chl *a/b* aránya AS párjaikhoz képest (4. táblázat) (Bajkán *et al.*, 2010) jelezheti a fotoszintetikus apparátus egy relatíve nagyobb fénybegyűjtő antenna méretét (Burke *et al.*, 1982; Holt & Goffner, 1985; Lemoine *et al.*, 1986), amely nagyobb mennyiségű többlet gerjesztési energia jelenlétéhez vezethet az antennában.

A Hendrickson és munkatársai (2004) által leírt modell a PSII antennájában elnyelt fényenergia sorsának az előbbinél egy egyszerűbb becslését nyújtja. A szignifikánsan alacsonyabb  $\Phi_{\text{PSII}}$  értékek az AR vonalakban jelzik, hogy az elnyelt fényenergiának kisebb

hányada alakult át kémiaiilag kötött energiává a fotokémiai töltésszétválasztás során, mint az AS vonalakban (10. a ábra). Ez jól korrelál az alacsonyabb fotoszintetikus teljesítmény indexszel ( $PI_{abs}$ ), különösen a gerjesztési energia befogásának lecsökkent arányával az AR vonalakban (5. táblázat és 7. ábra). A PSII fotokémiájának lecsökkent hatásfoka ( $\Phi_{PSII}$ ) vagy a  $\Phi_{NPQ}$  vagy a  $\Phi_{NO}$  vagy mindkét folyamat feltétlen növekedését eredményezi. A  $\Phi_{NPQ}$  és a  $\Phi_{NO}$  paraméterek azt az energia frakciót mérik, mely két, egymással versengő, nem-produktív folyamat által disszipálódhat: míg a  $\Phi_{NPQ}$  a szabályozási folyamatok által indukálódik, ezzel szemben minden egyéb nem-fotokémiai energia-veszteséget a  $\Phi_{NO}$  képvisel. A *S. nigrum* szülő biotípusai és hibridjei között nem találtunk különbséget a  $\Phi_{NPQ}$  értékeiben (10. c ábra), viszont a qE lecsökkent a  $\Phi_{NO}$  növekedése mellett az AR vonalakban (3. táblázat és 10. e ábra). Mind a  $\Phi_{NPQ}$  mind a  $\Phi_{DL}$  a  $\Delta pH$ -, Zea- és PsbS által szabályozott fotoprotektív NPQ mechanizmussal vannak kapcsolatban. A PSII akceptor oldali kisebb sebességű elektrontranszport ( $J_{ETR}$ ) az AR vonalakban (10. b ábra) korlátozhatja a lumenális proton akkumulációt. Továbbá a D1 protein fény által indukált magasabb degradációs/helyreállítási folyamata az AR gyomokban (Sundby *et al.*, 1993a; Darkó *et al.*, 2000) maga után vonhat egy megnövekedett ATP igényt, ami az ATPáz enzimen keresztül magasabb proton effluxot eredményezhet, mely szintén hozzájárulhat a tilakoid membránon keresztüli proton gradiens kiépülésének csökkenéséhez. Ez magyarázatot adhat a 20%-kal alacsonyabb xantofill de-epoxidációra, amely pedig hozzájárulhat a qE csökkenéséhez. Tehát nem zárható ki, hogy a  $Q_A$  és a  $Q_B$  közötti elektrontranszport lassulása a D1 protein mutáns növényekben (Pfister & Arnzten, 1979; Bowes *et al.*, 1980) a lumen mérsékelt acidifikációját okozza, azonban a szakirodalomban általánosan elfogadott tény az, hogy a teljes fotoszintetikus elektrontranszport sebesség-limitáló lépése normál fiziológiás körülmények között a Cyt *b<sub>6</sub>/f* komplex általi PQ készlet oxidációja (Genty & Harbinson, 1996). A CO<sub>2</sub> asszimiláció (3. táblázat) (Bajkán *et al.*, 2010) és a fotorespiráció sebességei (3. táblázat és 15. c ábra) sem változtak a mutáció hatására, ami azt mutathatja, hogy a  $Q_A$  és  $Q_B$  közötti elektrontranszport lassulása ellenére sem a PSII limitálja a teljes elektrontranszportlánc sebességét az AR növényekben. Haehnel (1984) és Graber (1987) kutatásai alapján a rezisztens növényekben a  $Q_A$  és  $Q_B$  közötti elektrontranszport sebesség 0,3-0,4 ms körüli értékének lelassulása 1-3 ms-ra még mindig kb. tízszer gyorsabb mint a PQ készlet oxidációjának 15-25 ms-os félideje.

Érdekes módon a qE lecsökkenését nem kíséri a  $\Phi_{NPQ}$  változása. Mivel a  $\Phi_{NPQ}$ -t nem érintette a D1 protein mutációja, az egyéb nem-fotokémiai energia veszteségek hatásfoka, a  $\Phi_{NO}$ , megemelkedett, mely a csökkent fotokémiai energia konverzió kompenzációs mechanizmusának tekinthető az AR vonalakban (10. e ábra). A  $\Phi_{NO}$  értelmezésére számos, részben különböző magyarázat létezik (Klughammer & Schreiber, 2008), de általában úgy definiálják, hogy az elnyelt fényenergiának az a frakciója, amely nem hasznosul a fotoszintetikus elektrontranszport során, és nem is eliminálódik a regulált hődisszipáció folyamatán keresztül, hanem passzív módon hő és fluoreszcencia formájában disszipálódik. A magasabb  $\Phi_E$  vagy  $\Phi_{NO}$  értékek és az alacsonyabb  $\Phi_{NPQ}/\Phi_{NO}$  arány a D1 protein mutáns vonalakban a fotoprotektív folyamatok szuboptimális kapacitását tükrözik (Klughammer & Schreiber, 2008), mely végső soron a fotokémiai apparátus károsodásához vezet, mivel a  $\Phi_E$  és a  $\Phi_{NO}$  frakció nagyobb hányada azt az elnyelt energiát képviseli, melyet nem lehet a regulált mechanizmusok által a PSII antennarendszeréből eltávolítani. Következésképpen a természetes módon kisselektálódott D1 mutáns gyomok magasabb érzékenysége a fotoinhibícióra (Holt *et al.*, 1981; Hart & Stemler, 1990; Sundby *et al.*, 1993a; Darkó *et al.*, 1996; 2000; Váradi *et al.*, 1994; 2003) nem meglepő, ha figyelembe vesszük, hogy a fotoinhibíció fő célpontja a PSII RC-ok D1 fehérjéje (Barber & Andersson, 1992; Aro *et al.*, 1993).

Összehasonlító tanulmányt végeztünk két, csökkent NPQ kapacitással rendelkező *A. thaliana* mutáns vonallal abban bízva, hogy közelebb jutunk a *S. nigrum* D1 protein mutáns biotípusának eltérő energia megoszlásának magyarázatához. Mivel megváltozott NPQ tulajdonsággal rendelkező mutáns vonalat a *S. nigrum* növényfaj esetében tudomásunk szerint ez idáig nem izoláltak, és a D1 protein mutáns *A. thaliana* vonalhoz nem jutottunk hozzá, ezért az *A. thaliana npq4-1* deléciós mutánsával és az *lhcb2* antiszensz vonallal végeztünk vizsgálatokat. Míg előzőben a *psbS* gén deléciója következtében a PsbS fehérje teljesen hiányzik, utóbbiban az LHCII fő alkotóelemei, az Lhcb1 és 2 fehérjék csaknem teljesen hiányoznak az *Lhcb2* antiszensz konstrukció kifejeződése miatt. Mindkét vonal az irodalomban jól ismert és jellemzett (Li *et al.*, 2000; 2002b; Ganeteg *et al.*, 2001; Andersson *et al.*, 2003; Ruban *et al.*, 2003). Ezekben a növényekben kb. 50%-os csökkenést tapasztaltunk az NPQ értékeiben közel telítési fényintenzitáson a vad típushoz képest (22. b ábra), miközben a  $J_{ETR}$  és a  $\Phi_{PSII}$  paraméterek értékei közel azonosak voltak mindhárom vonalban (22. a és 23.

a ábrák). A Hendrickson és munkatársai (2004) modelljének alkalmazása azt mutatta, hogy az aktinikus fényre adott válaszgörbék esetében az alacsonyabb NPQ kapacitás, sőt magának a görbének az alakja is egyértelműen tükröződik a  $\Phi_{NPQ}$  görbék alacsonyabb amplitudójában és felfutásában mindkét mutáns vonalban (22. b és 23. b ábrák) (Bajkán *et al.*, 2011, közlésre elfogadva). Az alacsonyabb  $\Phi_{NPQ}$  értékekkel párhuzamosan a  $\Phi_{NO}$  megemelkedését tapasztaltuk (23. c ábra). Az *npq4-1* és az *lhcb2* *A. thaliana* mutánsok alacsonyabb fotoprotektív kapacitása következetesen tükröződött tehát az alacsonyabb  $\Phi_{NPQ}$  értékekben, azonban érdekes módon a *S. nigrum* D1 protein mutáns biotípusában a kisebb NPQ kapacitás mellett azonos  $\Phi_{NPQ}$ -t tapasztaltunk a vad és a mutáns biotípusokban. Habár a PsbS és az LHC proteinek nukleárisan kódoltak, a D1 protein a kloroplasztisz genom része. Úgy gondoljuk, hogy a különféle megváltozott NPQ tulajdonsággal rendelkező mutánsokon végzett biokémiai és molekuláris genetikai tanulmányok közvetlenül nem illeszthetők rá a D1 protein mutáns biotípusú növények esetére a tanulmányozott mutációk alapvető különbségei miatt. Az *A. thaliana* növények magas és alacsony NPQ kapacitással rendelkező természetes változataival végzett újkeletű kutatások arra utalnak, hogy az NPQ kapacitásban meglévő különbségek néhány, eddig még nem ismert faktor szabályozása alatt állhatnak (Jung & Niyogi, 2009).

A D1 fehérje mutáció következményeként a gyors Chl fluoreszcencia tranziensek alakja különbözött a kétféle biotípusban és a megfelelő hibridjeikben (6. ábra). Hasonló különbségeket az OJIP tranziensek alakjában korábban is leírtak *Chlamydomonas* D1 protein mutánsaira és néhány gyom esetében (El-Lithy *et al.*, 2005; Kohno *et al.*, 2000; Srivastava *et al.*, 1995; van Rensen *et al.*, 2001). Az OJIP tranziensek kinetikáját a  $Q_A$  redox állapotának változásai határozzák meg, de egyúttal a fotoszintetikus elektrontranszportlánc redukcióját is tükrözi. A tranziensek J és I szintjei és I-P fázisa a  $Q_A$  redox állapotával, a PQ készlet redox állapotával és a PSI elektron akceptor oldalán lévő végső akceptorok redox állapotával függenek össze (Tsimilli-Michael & Strasser, 2008). Jóllehet az így kapott eredmények nem nyújtanak információt egy állandósult körülményre jellemző fotoszintetikus aktivitásról, csupán betekintést engednek egy sötétadaptált minta optimális-maximális hatékonyságába. A sötétadaptált leveleken mért gyors Chl fluoreszcencia tranziensek analízise egyértelműen jelezte a PSII működésének gyengülését az akceptor oldalon (úgy mint az excitonok RC-ok általi befogásának hatásfoka, a  $Q_A$  redukált formájának gyors felhalmozódása, ekképpen a PSII RC-ok gyors záródása, az elektrontranszport hatásfoka, az elektrontranszfer fluxusa per

RC) az AR vonalakban, összehasonlítva AS párjaikkal (5. táblázat). Eszerint az AS és az AR biotípusok közötti fő különbség a PSII köztes elektron akceptor készlet feltöltésének kinetikájában van, ahogyan ezt van Rensen és munkatársai (2001) is fejtegették. A  $PI_{abs}$  fotoszintetikus teljesítmény indexben a PSII komplex mind strukturális, mind működési jellemzése bennefoglaltatik. A D1 fehérje mutáció csakugyan csökkentette a PSII működésének intenzitását, amely jól látszik a  $PI_{abs}$  50%-os esésében, ami valószínűleg okozhatja az alacsonyabb NPQ kialakulását, ahogyan ezt már korábban mások is feltételezték (Darkó *et al.*, 2000; Váradi *et al.*, 2003). Azonban a  $\Phi_{NPQ}$  és a  $CO_2$  asszimiláció fénytélítési sebességeinek hasonló értékeire a *S. nigrum* AS és AR vonalaiban ez nem ad magyarázatot (3. táblázat) (Váradi *et al.*, 2003; Bajkán *et al.*, 2010).

A PSI végső akceptorainak redukcióját jellemző gyors Chl fluoreszcencia paraméterek ( $RE_o/RC$ ,  $\phi_{Ro}$ ,  $\psi_{Ro}$ ) nem különböztek szignifikánsan a kétféle biotípusban és azok hibridjeiben. A  $\delta_{Ro}$  paraméter azonban, mely annak a valószínűségét fejezi ki, amellyel egy elektron a köztes elektron akceptorok felől a PSI végső akceptorokhoz eljut, az AR biotípusokban jelentősen megnövekedett (5. táblázat és 7. ábra). A megemelkedett  $\delta_{Ro}$  paraméter a  $V_J$  növekedéséből adódott, míg a  $V_I$  nem különbözött szignifikánsan a biotípusokban. A JIP-teszt analízis során a D1 protein mutáns vonalakban magasabbnak bizonyul az az arányszám ( $\delta_{Ro}/(1 - \delta_{Ro})$ ), mely azt jellemzi, hogy egy elektron a redukált köztes akceptorok felől a PSI végső akceptorokhoz jut. Ez feltételezhetően kompenzálhatja a PSII akceptor oldali alacsonyabb elektronáram-sebességet és a  $PI_{abs}$ -t, és hasonló  $PI_{total}$  értékeket eredményez a *S. nigrum* biotípusaiban (5. táblázat). A hasonló  $PI_{total}$  értékek valószínűsítik a redukáló erők összehasonlítható mennyiségének kialakulását a PSI akceptor oldalán mindkét biotípusban. A PSI körüli ciklikus elektrontranszportról néhányan azt tartják, hogy jelentős elektronáramot képes fenntartani és ezáltal hozzájárul a lumen acidifikációjához (Miyake *et al.*, 2004; Munekage *et al.*, 2004). Termolumineszcencia (TL) vizsgálatok a *Chenopodium album* AR biotípusában kimutatták az AG sáv meglétét, mely azokból a PSII centrumokból származik, melyekben az oxidált  $Q_B$ -t a PQ készlet felőli, sztróma redukciósokból származó, reverz irányú elektrontranszport redukálja (Sundblad *et al.*, 1988). Ennek a TL sávnak a kialakulásához ciklikus elektrontranszport és magas lumen protonkoncentráció szükséges (Ducruet *et al.*, 2005). A  $RE_o/RC$ ,  $\phi_{Ro}$ ,  $\psi_{Ro}$  JIP-teszt paraméterek hasonlósága a biotípusokban és különösképpen a megnövekedett  $\delta_{Ro}$  az AR vonalakban valamennyien a PSI végső akceptorainak (Fd, NADP) redukcióját tükrözik, ami az

AG sáv jelenlétével együtt egy aktív PSI körüli ciklikus elektrontranszportra és hozzákötött protontranszferre utal.

Összegzésként elmondható, hogy a *psbA* gén által kódolt, erősen konzervált D1 protein szerepét az elnyelt többletenergia termális disszipációjának hatékony kialakulásában esszenciálisnak véljük, miként ezt a kloroplasztisz genomban kódolt S264G D1 mutáció és az alacsony NPQ kapacitás együtt-öröklődése igazolta. Az eredményeink azt mutatják, hogy az általunk vizsgált Chl fluoreszcencia tulajdonságokat, úgymint az OJIP tranzienseket és a JIP teszt paramétereit, az NPQ-t és a PSII antennája által elnyelt energia allokációs mintázatot a D1 protein befolyásolja az AS és az AR biotípusú *S. nigrum* növények leveleiben.

A szárazság napjainkban igen fontos környezeti tényezővé vált, mely a növekedés gátlását eredményezi a fotoszintézis folyamatának limitálása révén. Természetes körülmények között a vízdeficit gyakran együtt jár a magas hőmérséklettel és/vagy a magas fényintenzitással (fénygátlás). Ismeretes, hogy a magas fényintenzitással (Sundby *et al.*, 1993a; Váradi *et al.*, 1994; Darkó *et al.*, 1996; 2000) és hőmérséklettel (Ducruet & Lemoine, 1985; Havaux, 1989) szemben az AR gyomoknak kisebb a toleranciájuk, mint a vad-típusú párjaiknak. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a szárazság, mint abiotikus faktor, hogyan befolyásolja az atrazin rezisztenciát hordozó *S. nigrum* növényekben az elnyelt fényenergia sorsát a vad biotípussal összehasonlítva; a vízdeficit befolyásolja-e a mutáns növények fitneszt.

A jó vízellátású kontroll AS és AR *S. nigrum* szülő biotípusokban a sztómák vezetőképessége ( $g_s$ ) közel azonosnak bizonyult, melyet az AR biotípusra jellemző alacsonyabb sztómasűrűség nem befolyásolt (14. a ábra). Korábbi kutatások nem találtak különbséget az AS és az AR biotípusok között a sztómasűrűséget illetően és a sztómák működésében (Ort *et al.*, 1983; Holt & Goffner, 1985). A CO<sub>2</sub> asszimiláció aktinikus fényre adott válaszgörbéi szintén hasonlóak voltak a kétféle kontroll biotípus leveleiben (15. a ábra) egyetértésben korábbi munkákkal (Váradi *et al.*, 2003), habár PSII-n keresztüli lineáris elektrontranszport sebessége ( $J_{ETR}$ ) szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult az AR biotípusban (5. b ábra,  $J_{ETR}$ ). Enyhe szárazság alatt a sztómazáródás az első lépés, amelyet szükségszerűen a fotoszintetikus reakciók megváltozása követ (Cornic & Briantais, 1991). Vízhány esetén a levelek asszimilációs rátája visszaesik, sőt mi több ez már akkor is tapasztalható, mielőtt a levelek vízállapotában változások játszódnának le, amikor a levegő

páratartalmának (Bunce, 1981) vagy a talaj vízpotenciáljának csökkenése bekövetkezik (Gollan *et al.*, 1986). Valóban, az öntözés megvonása után először a  $g_s$  esett vissza, melyet röviddel ezután, néhány nap múlva, a RWC és a levelek átlagos vízpotenciáljának ( $\Psi$ ) csökkenése is követett mindkét biotípusban (14. ábra és 8. táblázat). Szembetűnő volt, hogy az AR biotípusban a szárazság által indukált csökkenés a vízháztartási paraméterekben később ment végbe, mint a vad típusban. A kétféle biotípus között a legnagyobb különbség főképpen az enyhe szárazság szakaszára (DH1) tehető, majd ez a különbség az idő előrehaladtával mérséklődött és meg is szűnt a DH2 szakaszban (14. ábra). Az AR biotípus levélszöveiteinek magasabb átlagos vízpotenciálja progresszív vízhiány alatt együtt járt a gázcserenyílások nagyobb mértékű nyitottságával és a magasabb  $g_s$  értékekkel.

Enyhe vízhiány mellett (DH1) a  $\text{CO}_2$  asszimiláció intenzitásának csökkenése valóban a sztómák vezetőképességének csökkenésével mutatott inkább összefüggést, mint a levél vízháztartási paramétereivel (RWC,  $\Psi$ ) (15. ábra). Kimutatták, hogy a száraz periódus fokozhatja a fotorespiráció mértékét (Cornic & Fresneau, 2002), ami szárazság idején hozzájárulhat a fotoszintetikus apparátus védelméhez a fény általi károsodással szemben (Chaves *et al.*, 2003). A fotorespiráció (az 1% és 21%  $\text{O}_2$  tartalmú levegőben meghatározott asszimilációs ráták különbsége) mértékének emelkedését tapasztaltuk vízdeficit alatt a *S. nigrum* mindkét biotípusában (15. d-i ábrák). A fotorespiráció mértéke, vagyis a fotorespirációs szén veszteség az AR biotípusban alacsonyabbnak bizonyult, mint az AS párjában, ami jól korrelál a sztómák nagyobb vezetőképességével, mely lehetővé teszi a  $\text{CO}_2$  jobb hozzáférhetőségét a Rubisco enzim számára a kloroplasztiszok sztrómájában. Ezalatt az AS biotípusban a nagyobb mértékű sztómazáródás a  $\text{CO}_2$  kisebb elérhetőségét vonta maga után ( $\text{C}_i$  csökkenése), melynek következtében a Rubisco enzim oxigenációs aktivitása megnövekedhetett a karboxiláció rovására.

A vízhiány alatt – a legtöbb esetben – a tilakoid membrán szerkezete ép maradt mindkét biotípusban (Függelék 1. ábra). A rehidrációt követően a helyreállási folyamatok végbementek, melynek köszönhetően 30 perccel a rehidráció után azt tapasztaltuk, hogy a  $\text{CO}_2$  asszimiláció megindult és egy gyors emelkedés után egy lassabb fázis következett (adatok nincsenek bemutatva). 24 óra elteltével a rehidráció után a helyreállási folyamatoknak köszönhetően a kloroplasztiszok a sejtfal mellett szorosan helyezkedtek el (Függelék 1. ábra).

A jó vízellátású kontroll biotípusok  $A/C_i$  görbéi gyakorlatilag nem különböztek a kétféle biotípusban, és a Rubisco aktivitása és/vagy extrahálható mennyisége ( $\epsilon$ ) és a RuBP regenerációjának maximális sebessége ( $J_{\max}$ ) szintén nagyon hasonlóak voltak (16. a ábra és 9. táblázat). Néhányan úgy gondolják, hogy a Rubisco csökkent aktivitása és/vagy mennyisége (Castrillo *et al.*, 2001; Parry *et al.*, 2002; Tezara *et al.*, 2002) vagy a RuBP regenerációjának elégtelen kapacitása (Tezara *et al.*, 1999; Thimmanaik *et al.*, 2002) a fotoszintézis limitáló faktora lehetnek főként vízdeficit esetén (Bota *et al.*, 2004). A vízmegvonás által indukált  $CO_2$  asszimiláció és az  $\epsilon$  csökkenése az AR biotípusban szignifikánsan alacsonyabb mértékű volt, mint az AS párjában (16. b és c ábrák). Az  $\epsilon$  paraméterről azt tartják, hogy a karboxilációs határfokot tükrözi, és általában a Rubisco enzim aktivitásával van összefüggésben (von Caemmerer, 2000). A növények rehidrációját követően 24 óra elteltével az  $A/C_i$  görbék amplitudója emelkedésnek indult (RuBP regenerációja), azonban a görbe kezdeti meredekségéből számolt Rubisco aktivitás közel változatlan maradt (16. ábra).

A *S. nigrum* AS és AR szülő biotípusok reciprok keresztezéseiből származó szárazságnak kitett F2 hibridek gázcsere vizsgálatai azt mutatták, hogy a szülő populációban meglévő különbség megszűnt az F2 hibridek esetében (ASF2 és ARF2) (9. táblázat és 18. ábra), és a kétféle biotípus (ASF2 és ARF2) a szülő AR típus értékeit közelítette a vízhiány alatt. Elképzelhető, hogy a szülő AR biotípus horgas, kampós alakú levélszörei, melyek a levél felületére kissé ráhajoltan helyezkedtek el (Függelék 2. ábra), hozzájárult a nagyobb vízmegtartó képesség kialakulásához. A fotoszintetikus teljesítmény mérsékeltebb visszaesése mellett, a nagyobb sztómanyitottság és a kedvezőbb levél vízpotenciál értékek együttes mutatkozása felveti az ozmotikumok nagyobb felhalmozódásának lehetőségét az AR növényekben, amely mérsékelheti az RWC-ben amúgy megmutatkozó vízvesztés káros élettani hatásait. Az AR biotípusra jellemző kampós levélszőrök is szerepet játszhatnak, növelve a levélfelületi diffúziós határréteg vastagságát, míg az AS típus egyenes szörei a levél felszínére közel merőlegesek voltak, ezáltal kisebb hatást kifejtve. Rendszerint a sztómák válaszreakciói szorosabb összefüggést mutatnak a talaj nedvességtartalmának, mint a levél vízállapotának megváltozásával. Ezek alapján feltételezik, hogy a sztómák reagálnak a dehidratált gyökerek produktumaira (pl. az abszcizinsav), mint kémiai jelemolekulákra (Davies & Zang, 1991). Ismeretes, hogy néhány növényfajban a szárazság hatására kifejezettebb abszcizinsav-függő sztómazáródás megy végbe (Riera *et al.*, 2005). Elképzelhető, hogy a *S.*

*nigrum* AR biotípusában kisebb mértékű lehet az abszcizinsav által mediált sztómazáródás a vélhetően fokozottabb vízmegtartó képesség miatt, mint az AS típusban. A szárazság elleni egyik védekező mechanizmus a növényekben a rendelkezésre álló víz konzerválása, mely pl. a sztómaszám lecsökkentésével valósulhat meg (Schulze, 1986), ez azonban az itt alkalmazott kísérleti elrendezésben nem játszhatott szerepet.

Az eredményekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a *S. nigrum* AR biotípusának vízhiánnyal szembeni fokozottabb toleranciája nem köthető az S264G D1 protein mutációjához, mivel a reciprok keresztezésekből származó, a szülő populációkban meglévő különbségek az F2 hibridekben elmosódtak. Úgy feltételezzük, hogy az általunk tapasztalt különbség a szülő populációknak az élőhelyhez való alkalmazkodása során a sejtmagi genetikai háttér módosulásával alakulhatott ki, vagy a számos pleiotrop hatás egyike, amely a szelektálódott populációban az önbeporzás következtében fennmaradhatott. Megállapíthatjuk, hogy az atrazin-rezisztens biotípus rosszabb fitnesze nem magyarázható a vízhiánnyal szembeni tolerancia-csökkenésével.

A fotokémiai energia konverzió ( $\Phi_{PSII}$ ) és a  $J_{ETR}$  értékei igen jelentősen, közel azonos értékre estek vissza mindkét biotípusban és hibridjeikben is az erős vízdeficit (DH3) következményeként a kontroll növényekéhez képest (20. a, b és 10. a, b). Az AR vonalakban drasztikus emelkedést tapasztaltunk az NPQ paraméter értékében a jó vízellátású kontrollokhoz képest, mialatt az AS vonalakban jóval kisebb mértékű volt ez az emelkedés (19. a és 21. h ábrák). Érdekes módon mind a fényintenzitás-függés, mind a kinetikai vizsgálatok során az NPQ görbék amplitudója és felfutása tükrözte a  $\Phi_{NPQ}$  görbékéét a vízhiányos növényekben (19. a, 20. c, 21. e és h ábrák), nem úgy, mint a kontrollok esetében (21. g, d, h és e ábrák). Szárazság alatt a regulált termális disszipáció fokozódása a fénybegyűjtő komplexekben valamiképpen magában foglalja a xantofill ciklust (Demmig-Adams & Adams, 1996) és a lutein ciklust (Matsubara *et al.*, 2001), jóllehet utóbbinak szerepe nem teljesen világos még. Amikor a CO<sub>2</sub> fixációja gátolt a szárazság alatt, a szabályozó folyamatok révén visszaesik az elektrontranszport sebessége, ezáltal egyensúlyt teremtve az elektronok lecsökkent szükségletével és minimálisra csökkentve a reaktív oxigén formák keletkezését. Ugyanakkor az NPQ megnövekszik, hogy mérsékelje a PSII-n lévő gerjesztési nyomást. Golding és Johnson (2003) vizsgálataik során azt a megfigyelést tették, hogy az 'aktív' PSI centrumok aránya megemelkedett a száraz periódus alatt. Feltételezéseik szerint

ezek elsődlegesen a ciklikus elektrontranszportban vesznek részt, amely a  $\Delta pH$  fokozásával hozzájárul az NPQ fenntartásához, és megvédi a PSII-t. Viszont, amennyiben feltesszük, hogy a fokozott PSI aktivitás segít kiigazítani a lassúbb lineáris elektrontranszport okozta  $\Delta pH$  elmaradást, fel kell tételeznünk, hogy a de-epoxidációban, NPQ és qE folyamatokban meglévő tagadhatatlan hiányt más, akár az S264G mutáció pleiotrop hatása, mint pl. a lipidösszetétel és a membrán fluiditás jelentős megváltozásai is okozhatják. Érdekes módon, míg a kontroll AR vonalakban az alacsonyabb NPQ kapacitás mellett közel azonos  $\Phi_{NPQ}$  és szignifikánsan magasabb  $\Phi_{NO}$  értékeket kaptunk, addig az erős szárazságnak kitett AR növények leveleiben a drasztikusan lecsökkent fotokémiai hatásfok mellett erőteljesen megnőtt a regulált energia disszipáció frakciója, mely tükrözte a megnövekedett NPQ-t és kissé csökkent a nem-regulált utak általi energia disszipáció hatásfoka a kontrollokhöz képest. Ezzel szemben a vízhiányos AS vonalak NPQ kapacitása csak kis mértékben emelkedett a kontrollokhöz képest, amely a  $\Phi_{NPQ}$ -ban is tükröződött, míg a  $\Phi_{NO}$  enyhén megnőtt a kontrollokhöz képest. Úgy tűnik tehát, hogy az AR vonalakban (AR, ARF2, ARF6) az erős szárazság által indukált fotoprotekciós folyamatok hatékonyabban működhetnek, mint az AS párjaikban (AS, ASF2, ASF6). Azonban ennek magyarázatához további vizsgálatokra lenne szükségünk. Az erős szárazságnak kitett szülő populációk és megfelelő hibridjeik a vizsgált fluoreszcencia tulajdonságokban nem különböztek egymástól, tehát e folyamatok a D1 protein mutációhoz köthetők. A vízhiányos mintában (DH3) a rehidratálás után a plasztiszszerkezet helyreállítását tapasztaltuk (Függelék 1. ábra), illetve a kontrollokhöz hasonló NPQ kinetika és energia allokációs mintázat is visszaállt mindkét biotípusban (21. i ábra).

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az oxigénfejlesztő fotoszintézis során a PSII molekuláris szerkezetének és működésének két egymással ellentétes követelményt kell kielégítenie. Egyrészt a napsugarak hatékony begyűjtése szükséges a fotoszintetikus elektrontranszportlánc meghajtásához és annak optimális sebességének fenntartásához. Másrészt a klorofill gerjesztett állapota és a molekuláris oxigén jelenléte egy potenciálisan letális környezetet teremt, amely a fehérjéket, lipideket és a fotoszintetikus membrán pigmentjeit irreverzibilisen károsíthatja. Ennek kivédésére a fotokémiai rendszer egyes kofaktora, úgymint a karotinoidok, amelyek a szingulett oxigén hatástalanításában és a  $^3\text{Chl}^*$  befogásában játszanak szerepet, illetve fotoprotektív mechanizmusok vannak jelen, amelyek a magas fényintenzitás által indukálódnak, és a  $^1\text{Chl}^*$  deaktivációját idézik elő.

Váradai és munkatársai (2003) kutatásai arra világítottak rá, hogy valamennyi vizsgált atrazin-rezisztens gyomfaj, mely hordozta a PSII reakciócentrum D1 proteinjének Ser<sub>264</sub>→Gly mutációját, egy lecsökkent fotoszintetikus hatékonyságú PSII-vel rendelkezett, ami az alacsonyabb fotokémiai kioltásban (qP), mely fokozza a PSII-re ható gerjesztési nyomást ( $1 - qP$ ), a PSII hatásfokának ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) és a lineáris elektrontranszport sebességének csökkenésében ( $J_{\text{ETR}}$ ) nyilvánult meg. Ezekben a mutánsokban a Zea fényindukált képződése és a termális disszipáció csökkent mértékűnek bizonyult. Mindezen megfigyelésekből arra következtettek, hogy ezen mutánsok nagyobb fényérzékenységének hátterében az elnyelt fény fotokémiai hasznosulásának és a nem-fotokémiai energia disszipáció arányának kedvezőtlen eltolódása állhat.

Az NPQ molekuláris mechanizmusa csak részben ismert, de kialakulásának feltételei jól behatárolhatóak: a tilakoid lumenének alacsony kémhatása, de-epoxidált xantofilok képződése, a PsbS és más LHCII fehérjék protonációja. Eddigi ismereteink szerint az NPQ kialakulását nukleárisan kódolt faktorok határozzák meg (Funk *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2000; Bugos & Yamamoto, 1996; Jansson, 1999), habár a D1 fehérjét kódoló *psbA* gén – amely a rezisztens növényekben a mutációt hordozza – a kloroplasztisz genom része (Morden & Golden, 1989). Nem világos, hogy a D1 protein hogyan járulhat hozzá az antennában végbemenő, hatékony nem-fotokémiai hődisszipáció kialakulásához.

Napjainkban a vízhiány az egyik legfontosabb abiotikus stressztényezővé vált, amely a növény növekedését/produktivitását limitálja a fotoszintézis gátlásán keresztül. Ismeretes az atrazin-rezisztens növények eltérő hőmérséklet-érzékenysége és adaptációs képessége (Ducruet & Lemoine, 1985), illetve fokozott fényérzékenységükről egyaránt beszámoltak (Hart & Stemler, 1990). Természetes körülmények között a vízdeficit gyakran együtt jár a magas hőmérséklettel és/vagy a magas fényintenzitással (fénygátlás). Felvetődött az a kérdés, vajon a vízdeficit befolyásolja-e a D1 protein mutáns növények fitnessét.

A célkitűzésekben megfogalmazottak alapján a reciprok keresztezések alanyaként a *Solanum nigrum* gyomfaj atrazin-szenzitív és rezisztens biotípusait választottam a laboratóriumunkban meglévő D1 protein mutáns gyomfajok közül. Ez a faj eredményesen nevelhető laboratóriumi körülmények között, viszonylag rövid életciklussal bír, jól kezelhető levelei vannak a gázcseremérések szempontjából, valamint a szülő populációk hagyományos keresztezési eljárással laboratóriumi körülmények között könnyen hibridizálhatók. A klorofill *a* fluoreszcencia indukció és JIP teszt paraméterek, a PSII energia allokációs mintázata, a DNS szekvencia analízis és az immunoblot vizsgálatok, a levélszél öröklődésének nyomkövetése, a CO<sub>2</sub> asszimiláció és vízháztartási paraméterek vizsgálata által kapott eredményeket áttekintve az alábbi megállapításokat teszem:

- A *S. nigrum* gyomnövény AS és AR szülő biotípusok reciprok keresztezésének sikerességét egy mendeli tulajdonság, a levélszél alak öröklődésének nyomkövetésével igazoltuk, mely bizonyította az F2 növényi anyag sejtmagi hibrid státuszának meglétét. Az F2 nemzedék levélszél alakjának várható – a Hardy-Weinberg modell szerint számolt – szegregációja és a kísérletesen megfigyelt adatok nem különböztek szignifikánsan, mely bizonyította az F2 populáció hibrid státuszának meglétét.
- A vizsgált szülői és hibrid vonalak esetében a D1 protein mutánsokban általánosan megfigyelhető volt az *in vivo* klorofill fluoreszcencia mérésekből számított PSII lineáris elektrontranszport sebesség, a fotokémiai kioltási koefficiens és a nem-fotokémiai kioltás csökkenése, ezen belül a gyorsan relaxálódó qE komponens csökkenése.
- A reciprok keresztezések eredménye azt mutatta, hogy az NPQ kapacitásbeli különbségeket nem befolyásolták a sejtmagi szabályozó faktorok a hibridekben egészen az F6 generációig. Ezzel összhangban van az az eredmény is, hogy a szekvencia analízis alapján a *S. nigrum*

AS és AR biotípusaiban azonosak voltak a PsbS fehérjék, azaz nem tartalmaztak aminosav eltérést, és a PsbS és D1 fehérjék expressziójában sem találtunk különbséget.

- A xantofill ciklus aktivitására vonatkozó méréseim alapján megállapítottam, hogy a D1 protein mutációval rendelkező valamennyi AR vonal kb. 20%-kal csökkent de-epoxidációs képességgel rendelkezett. A xantofill ciklus készletek nagysága között a kétféle biotípusban és hibridjeikben nem mutatható ki különbség. A xantofill ciklus kisebb kapacitásával részben megmagyarázható az NPQ (vagy qE) folyamatok csökkenése az AR biotípusokban.
- Az alkalmazott kétféle PSII energia allokációs modell eredményei alapján megállapítottam, hogy az elnyelt fényenergiának kisebb hányada alakult át kémiai kötött energiává a fotokémiai töltésszétválasztás során ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ), amely összefüggésbe hozható az AR vonalak 50%-kal alacsonyabb fotoszintetikus teljesítmény indexével ( $\text{PI}_{\text{abs}}$ ), főképpen a gerjesztési energia befogásának lecsökkent hatékonysága ( $\phi_{\text{P}_0}/(1 - \phi_{\text{P}_0})$ ) következtében. Az AR vonalakra jellemző csökkent fényindukált fotoprotektív NPQ (vagy qE) kapacitás ellenére a regulált hődisszipáció hatásfokát ( $\Phi_{\text{NPQ}}$  vagy  $\Phi_{\text{DL}}$ ) nem befolyásolta a D1 protein mutáció. A kisebb PSII hatásfok mintegy kompenzációs mechanizmusaként ezáltal a nem-regulált energiaveszteség frakciójának ( $\Phi_{\text{NO}}$  vagy  $\Phi_{\text{E}}$ ) szignifikáns megnövekedését tapasztaltam a mutáns vonalakban, amely a disszipáció nem fotoprotektív módját jelenti és így közvetlenül hozzájárulhat az AR növények gyengébb fitneszéhez.
- Megállapítottam, hogy az AR vonalak sötétadaptált levelein mért gyors klorofill fluoreszcencia tranziensek (OJIP) analízise egyértelműen jelezte a PSII működésének gyengülését az akceptor oldalon (úgy mint az excitonok RC-ok általi befogásának hatásfoka, a  $\text{Q}_\text{A}$  redukált formájának gyors felhalmozódása, ekképpen a PSII RC-ok gyors záródása, az elektrontranszport hatásfoka, az elektrontranszfer fluxusa per RC). A D1 fehérje mutáció csökkentette a PSII működésének intenzitását, amely jól látszik a  $\text{PI}_{\text{abs}}$  50%-os esésében, ami hozzájárulhat az alacsonyabb NPQ kialakulásához. Azonban a  $\Phi_{\text{NPQ}}$  és a maximális asszimilációs ráta ( $A_{\text{max}}$ ) hasonló értékeire a *S. nigrum* AS és AR vonalaiban ez nem ad magyarázatot. Megállapítottam, hogy a PSI végső akceptorainak redukcióját jellemző JIP-teszt paraméterek ( $\text{RE}_0/\text{RC}$ ,  $\phi_{\text{R}_0}$ ,  $\psi_{\text{R}_0}$ ) nem különböztek szignifikánsan a kétféle biotípusban és hibridjeikben. A  $\delta_{\text{R}_0}$  paraméter azonban, mely annak a valószínűségét fejezi ki, amellyel egy elektron a köztes elektron akceptorok felől a PSI végső akceptorokhoz eljut, az AR biotípusokban jelentősen megnövekedett. Ez feltételezhetően kompenzálhatja a PSII

akceptor oldali alacsonyabb elektronáram sebességet és a  $PI_{abs}$ -t, és hasonló  $PI_{total}$  értékeket eredményez a *S. nigrum* biotípusaiban.

Az eredményeink azt mutatják, hogy az általunk vizsgált klorofill fluoreszcencia tulajdonságokat, úgymint a gyors Chl fluoreszcencia tranzienseket és a JIP teszt paramétereit, a PSII antennája által elnyelt energia allokációs mintázatot és az NPQ-t a D1 protein befolyásolja az AS és AR biotípusú *S. nigrum* növények leveleiben. Az erősen konzervált D1 protein szerepét az elnyelt többletenergia nem-fotokémiai hődisszipációjának hatékony kialakulásában esszenciálisnak véljük, ahogyan ezt a kloroplasztisz genomban kódolt S264G D1 protein mutáció és az alacsony NPQ (vagy qE) kapacitás együtt-öröklődése igazolta.

A vízdeficit hatására vonatkozó megállapítások:

- Megállapítottam, hogy az aktinikus fényre adott válaszgörbék alapján, valamint az intercelluláris  $CO_2$  koncentráció függvényében meghatározott, egységnyi levélfelületre vonatkoztatott  $CO_2$  asszimilációs ráták gyakorlatilag nem különböztek a kétféle szülő biotípusban. A vízháztartási paraméterek értékei, sztóma konduktancia, levél relatív víztartalom, levél vízpotenciál ( $g_s$ , RWC,  $\Psi$ ) szintén nagyon hasonlóak voltak a kétféle biotípusban, és az AR biotípus alacsonyabb sztómasűrűsége nem befolyásolta a  $g_s$ -t.
- A progresszív vízhiány mindkét biotípusban előidézte a sztómák záródását, csökkentve a kloroplasztiszba jutó  $CO_2$  mennyiségét, s mindez a  $g_s$ , az intercelluláris  $CO_2$  koncentráció és a  $CO_2$  asszimiláció intenzitásának csökkenésében mutatkozott meg. Ezt követően néhány nap késéssel az egyéb vízháztartási paraméterek ( $\Psi$ , RWC) értékeiben is csökkenést figyeltem meg. Az asszimilációs ráta csökkenésével párhuzamosan a fotorespiráció mértékének fokozódását figyeltem meg progresszív vízhiány alatt. Megállapítottam, hogy az AR biotípus a vízháztartási paraméterek és a  $CO_2$  asszimiláció alapján toleránsabb volt a vízmegvonással szemben. A vízháztartási paraméterek és az asszimilációs ráta csökkenése később következett be az AR biotípusban, mint az AS párjában. Ezt tükrözte a kisebb mértékű fotorespiráció, a magasabb maximális asszimilációs ráta ( $A_{max}$ ), a nagyobb karboxilációs hatékonyság ( $\epsilon$ ) és a RuBP nagyobb

regenerálódási sebessége ( $J_{\max}$ ) is. A vízmegvonás előrehaladtával a kétféle biotípus közötti különbség mérséklődött, illetve a közepes vízhiány szakaszában el is tűnt.

- A reciprok keresztezésekből származó F2 hibridekkel folytatott vizsgálatok eredményei alapján megállapítom, hogy a szülő AR biotípus szárazsággal szembeni nagyobb toleranciája nem köthető a D1 protein mutációhoz, mivel a szülő populációkban meglévő tulajdonságok az F2 nemzedékben elmosódtak. Feltételezem, hogy az általam tapasztalt különbség a szülő populációknak az élőhelyhez való alkalmazkodása során a sejtmagi genetikai háttér módosulásával alakulhatott ki, vagy a számos pleiotrop hatás egyike, amely a szelektálódott populációban az önbeporzás következtében fennmaradhatott. Megállapítom továbbá, hogy az atrazin-rezisztens biotípus rosszabb fitnesze nem magyarázható a vízhiánnyal szembeni tolerancia-csökkenésével.
- A PSII hatásfoka ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) és a lineáris elektrontranszport sebessége mindkét erősen vízhiányos biotípusban és hibridjeikben közel azonos értékekre estek vissza. Valamennyi AR vonalban drasztikus NPQ növekedést figyeltem meg, míg a vad-típusú AS párjaikban kisebb mértékű volt ez az emelkedés. Meglepő módon a  $\Phi_{\text{NPQ}}$  és az NPQ összefüggést mutatott, nem úgy, mint a kontroll növények esetében. A  $\Phi_{\text{NO}}$ , mint komplementer folyamat, az AR vonalakban kissé lecsökkent, míg a vad típusú párjaikban megemelkedett a jó vízellátású kontrolljaikhoz képest.
- A progresszív vízhiánynak kitett szülő populációk és megfelelő hibridjeik a vizsgált fluoreszcencia tulajdonságokban nem különböztek egymástól, így e folyamatok a D1 protein mutációhoz köthetők, szemben a  $\text{CO}_2$  asszimilációbeli különbségekkel. A vízhiányos mintában a rehidratálás után a plasztiszszerkezet helyreállítását, illetve a kontrollokhoz hasonló PSII energia allokációs mintázat és NPQ kinetika visszaállását tapasztaltam mindkét biotípusban.

Úgy tűnik tehát, hogy az AR vonalakban a klorofill fluoreszcencia vizsgálatok alapján az erős szárazság által indukált fotoprotekciós folyamatok hatékonyabban működhetnek, mint az AS párjaikban. Ezt részben magyarázhatná a PSI körüli ciklikus elektrontranszport fokozódása, amely a  $\Delta\text{pH}$  létrehozásával hozzájárul az NPQ fenntartásához, és mérsékli a PSII-n lévő gerjesztési nyomást. Szárazság alatt a regulált termális disszipáció fokozódása a fénybegyűjtő komplexekben valamiképpen magában foglalja a xantofill ciklust és a lutein ciklust, habár

utóbbi szerepe nem teljesen világos még. A kloroplasztisz vízdeficit hatására végbemenő szerkezeti újra-rendeződése szintén hozzájárulhat valamilyen formában a hatékonyabb hődisszipáció kialakulásához az AR növényben. Ezt alátámasztani látszik az a tény, hogy a rehidratálás után a plasztiszszerkezet helyreáll, melynek következtében visszaáll a kontrollokhöz hasonló PSII energia allokációs mintázat és NPQ kinetika mindkét biotípusban és hibridjeikben. Azonban e jelenség magyarázatához további vizsgálatokra lenne szükségünk.

## 8. SUMMARY

In the course of oxygenic photosynthesis the molecular structure of PSII should satisfy two antagonistic criteria. On one hand it should be organized so that is suitable for the efficient collection of light and to transferring the excitation energy to the reaction centres to drive the electron transport chain. On the other hand the excited chlorophyll molecules in the presence of molecular oxygen represent a potentially lethal environment which can irreversibly damage the proteins, lipids and other components of the photosynthetic membrane. In order to counteract this process some sort of photoprotective mechanism had to be evolved which comes into effect under high light condition and deactivates singlet excited chlorophylls ( $^1\text{Chl}^*$ ). Also, certain cofactors of the photosynthetic machinery, such as carotenoids, play a significant role in scavenging singlet oxygen ( $^1\text{O}_2^*$ ) and/or in relaxation of triplet excited chlorophylls ( $^3\text{Chl}^*$ ).

It has been shown by Váradi and co-workers (2003) that all of the atrazine-resistant weed species in their investigation, which carried a mutation of Ser<sub>264</sub>→Gly on their D1 protein of PSII reaction centre, exhibited diminished PSII activity. This was described by a decrease in photochemical quenching (qP), which also means higher excitation pressure on PSII ( $1 - \text{qP}$ ), and by a decrease of both the PSII efficiency ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) and the linear electron transport rate ( $J_{\text{ETR}}$ ). In these mutants the light-induced formation of zeaxanthin and the thermal dissipation of excess energy were both impaired. The authors concluded that in these mutants the increased sensitivity to light can be attributed to the non-favourable change in the ratio of photochemical utilization and non-photochemical quenching (NPQ) of the absorbed light.

Although the exact molecular mechanism of NPQ is not yet fully understood several of its preconditions are well known, such as acidification of the thylakoid lumen, de-epoxidation of the xanthophyll-cycle pigments and/or protonation of PsbS and other light-harvesting complexes (LHCs). There is a general consensus that NPQ is controlled by factors that are encoded in the nucleus (Funk *et al.*, 1995; Bugos & Yamamoto, 1996; Jansson, 1999; Li *et al.*, 2000). Since the D1 protein encoding *psbA* gene, which carries the mutation in the atrazine-resistant plants, is localized in the chloroplast genome (Morden & Golden, 1989), it is not

entirely clear in what way the D1 protein can contribute to the formation of efficient non-photochemical dissipative processes in the antenna.

Nowadays, drought stress has become one of the most important abiotic factors, which limits the growth and/or productivity of the plants *via* inhibiting the photosynthetic machinery. The different sensitivity of the atrazine-resistant plants to the ambient temperature and their ability to adapt to various environmental conditions are well documented (Ducruet & Lemoine, 1985) as well as their increased susceptibility to high light (Hart & Stemler, 1990). In their natural environment the lack of water often goes hand in hand with high ambient temperature and/or elevated light levels (photoinhibition). This led us to raise the question whether the drought stress can influence the fitness of the D1 protein mutant plants.

In order to pursue this investigation I selected the atrazine-sensitive and resistant (AS and AR) biotypes of *Solanum nigrum* out of the D1 protein mutant weed species that we had access to in our laboratory. This particular weed can be efficiently grown in laboratory conditions; they have a fairly short life-cycle, their leaves are very suitable for gas exchange measurements and the parent populations can easily be hybridized by standard cross breeding methods. Throughout this investigation I have focussed my interest on the chlorophyll *a* fluorescence induction and JIP test parameters, the energy allocation pattern in PSII, DNA sequence and immunoblot analysis, the inheritance of leaf margin, CO<sub>2</sub> assimilation and the properties of water balance. The results can be summarized as follows:

- The turn out of the reciprocal crossing of the AS and AR biotypes of *S. nigrum* were analyzed by following the inheritance of a Mendelian trait of the plants, the leaf margin. Since the expected segregation of leaf margin type in F<sub>2</sub> – calculated according to the Hardy-Weinberg model – and the observed numbers did not differ significantly, it thus justifies the hybrid status of the F<sub>2</sub> population.
- Using *in vivo* Chl*a* fluorescence techniques I managed to show, in the D1 mutants of both the parent and their hybrid lines, a decrease in the PSII linear electron transport rate, in the photochemical quenching parameter, and a drop off in the NPQ and its fast relaxing qE component, in particular.
- The results of the reciprocal crossings proved that the differences in the NPQ capacity between the AS and AR types is not influenced by the regulatory factors in the nuclei of

the hybrids down to the F6 generations. This finding is in accordance with the DNA analysis of the AS and AR biotypes of *S. nigrum*, which showed no alteration in the amino acid sequence of the PsbS protein and there were no differences in the expression of the PsbS and D1 proteins, either.

- Investigating the xanthophyll-cycle activity I found that all AR lines, possessing the mutation on the D1 protein, exhibited a roughly 20% decrease in their aptitude for de-epoxidation, however, in the two biotypes and their hybrids, there was no significant difference in the size of their xanthophyll-cycle pool. The reduced capacity of the xanthophyll-cycle in the AR biotypes can partially explain the impaired NPQ (or qE) processes found in these plants.
- The two models used in determining the energy allocation pattern in PSII led me to conclude that during the photosynthetic charge separation a smaller fraction of the absorbed light energy was converted to chemically stored energy ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) in the AR lines, which can be related to the 50% lower photosynthetic performance index ( $\text{PI}_{\text{abs}}$ ), and in particular, the drop in the efficiency in capturing the excitation energy ( $\phi_{\text{Po}}/(1 - \phi_{\text{Po}})$ ). Despite the lower light induced photoprotective NPQ (or qE) capacity of the AR lines the efficiency of the regulated thermal dissipation of the excitation energy ( $\Phi_{\text{NPQ}}$  or  $\Phi_{\text{DL}}$ ) was not affected by the mutation on the D1 protein. As a compensatory mechanism to counteract the lower PSII efficiency in the mutant lines a significant increase in the non-regulated energy losses ( $\Phi_{\text{NO}}$  or  $\Phi_{\text{E}}$ ), which represents the non-photoprotective way of energy dissipation, was found, potentially contributing to the lower fitness of the AR plants.
- The analysis of the fast Chl *a* fluorescence transients (OJIP) of the dark-adapted leaves of the AR biotypes revealed a decline in PSII performance on the acceptor side (as indicated by the decreasing efficiency of the RCs in capturing the excitation energy, the fast accumulation of reduced  $\text{Q}_\text{A}$  and the fast closure of PSII RCs, the efficiency of electron transport and the electron transfer flux per RC). The mutation on the D1 protein impaired the functioning of PSII, as implied from the 50% decline in  $\text{PI}_{\text{abs}}$ , which, in turn, can contribute to the lower NPQ capacity. However, this cannot explain the similar values of  $\Phi_{\text{NPQ}}$  and maximal assimilation rate ( $A_{\text{max}}$ ) in the AS and AR lines of *S. nigrum*. The JIP test parameters ( $\text{RE}_0/\text{RC}$ ,  $\phi_{\text{Ro}}$ ,  $\psi_{\text{Ro}}$ ), characterizing the reduction of the final electron acceptors of PSI, were found to be within statistical significance in both biotypes and in

their hybrids. However, the  $\delta_{Ro}$  parameter, which represents the efficiency to transfer an electron from the intersystem electron carriers to reduce the final electron acceptors on the acceptor side of PSI, has increased significantly in the AR lines. This, presumably, can compensate the slower electron flow rate on the acceptor side of PSII as well as the lower  $PI_{abs}$ , and yields similar  $PI_{total}$  values in both biotypes of *S. nigrum*.

These results show, that the D1 protein has an influence on the Chl *a* fluorescence properties, such as the fast Chl fluorescence transients and the JIP test parameters, as well as on the energy allocation patterns in PSII and the NPQ of both the AS and AR biotypes of *S. nigrum*. We believe that the highly conserved D1 protein plays an essential role in the formation of thermal dissipation processes to de-activate the excess excitation energy, as it was demonstrated by the co-inheritance of the S264G mutation on the D1 protein, which is encoded in the chloroplast genome, and the low levels of NPQ (or qE) capacity.

The main findings of our investigation concerning the effects of drought stress are as follows:

- The results show that the CO<sub>2</sub> assimilation rates per unit leaf surface area, based on the evaluation of the actinic light response curves as a function of intercellular CO<sub>2</sub> concentration, did not differ significantly in the two parent biotypes. The water balance parameters, such as the stomatal conductance ( $g_s$ ), the relative water content of the leaves (RWC) and the water potential ( $\Psi$ ), were very much alike in the two biotypes and even the larger stoma density in the AR biotype had practically no effect on  $g_s$ .
- In both biotypes the progressive water famine led to the closure of the stomata, preventing CO<sub>2</sub> intake by the chloroplasts, which manifested in a decrease of the intercellular CO<sub>2</sub> concentration as well as a drop in  $g_s$  and the in CO<sub>2</sub> assimilation rate. This was followed, after a few days, by a decline in other water balance parameters (RWC,  $\Psi$ ). Parallel with the decrease in the CO<sub>2</sub> assimilation rate, a rise in the extent of photorespiration was observable as a consequence of the gradual water deficit. Based on the water balance parameters and the CO<sub>2</sub> assimilation rate one can conclude that the AR biotype was more tolerant towards the detention of water: both the water balance parameters and the CO<sub>2</sub> assimilation rate started decreasing somewhat later in the AR biotype than in its AS

counterpart. This was also substantiated by a weaker photorespiration, a higher rate of maximal assimilation ( $A_{\max}$ ), increased carboxylation efficiency ( $\epsilon$ ) and a higher regeneration rate of RuBP ( $J_{\max}$ ). The difference between the two biotypes gradually diminished with the progression of water detention and it practically disappeared during the intermediate phase of dehydration.

- The results of the investigations with the F2 generation of the reciprocal cross breeding shows that the higher drought tolerance of the parent population of the AR biotype cannot be linked to the D1 mutation as the traits present in the parent population become blurred in the F2 generation. We argue that the differences seen in the parent population are the consequence of their adaptation to the environment, causing alterations in the genetic material of the nuclei, or the result of one of the several pleiotropic effects, which could sustain in the selected population *via* the self-pollination. We also conclude that the lower fitness of the AR lines cannot be explained by their weakened tolerance towards water detention.
- In both biotypes and their hybrids, which suffered severe dehydration, the magnitude of PSII efficiency and that of the linear electron transport rate drops back to similar levels. The NPQ has increased dramatically in all AR lines, whereas the increase was much less pronounced in their AS counterparts. Surprisingly, we could observe a correlation between  $\Phi_{\text{NPQ}}$  and NPQ, unlike in the case of their well watered controls. The levels of  $\Phi_{\text{NO}}$ , representing a complementary process, were found to be somewhat decreased in the AR lines, while an increase was observed in the wild-type plants as compared to their well watered control pairs.
- As the fluorescence properties of the parent populations, which went through progressive dehydration, and their corresponding hybrids were found to be very similar the aforementioned observations can be linked to the mutation on the D1 protein, unlike the differences in  $\text{CO}_2$  assimilation. After rehydration the membrane structure of chloroplast was largely restored and similarly the energy allocation pattern of PSII and the NPQ kinetics were found to be much like to those observed in the control plants, in both biotypes.

Based on the fluorescence parameters it seems reasonable to conclude that the photoprotection mechanisms induced by severe water detention are more efficient in the AR lines than in their AS counterparts. This can be, up to a certain extent, substantiated by the enhancement of the cyclic electron flow around the PSI, which can contribute to maintaining the NPQ by building up a transmembrane  $\Delta pH$ , hence lessening the excitation pressure on PSII. The augmentation of the regulated thermal dissipative processes in the light-harvesting complex under drought stress conditions can somehow involve the xanthophyll- and lutein-cycles, however, the exact role of the latter in this process has not yet fully understood. In the AR plants the structural re-arrangement of chloroplasts, as a result of water detention, can also contribute, to some extent, to a more efficient thermal dissipation mechanism. This can be supported by the fact that, after re-hydration, the membrane structure of the chloroplasts is mostly restored, which leads to similar energy allocation patterns in PSII and NPQ kinetics in both biotypes and in their hybrids, as compared to those in their controls. However, in order to gain a better understanding of this phenomenon further investigations are required.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

- Adams WW, Demmig-Adams B, Winter K (1990) Relative contributions of zeaxanthin-related and zeaxanthin-unrelated types of 'high-energy state' quenching of chlorophyll fluorescence in spinach leaves exposed to various environmental conditions. *Plant Physiol* 92: 302-309
- Ahn TK, Avenson T, Ballottari M, Cheng YC, Niyogi KK, Bassi R, Fleming GR (2008) Architecture of a charge-transfer state regulating light harvesting in a plant antenna protein. *Science* 320: 794-797
- Allen JF, Bennett J, Steinback KE, Arntzen CJ (1981) Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems. *Nature* 291: 1-5
- Amarie S, Standfuss J, Barros T, Kühlbrandt W, Dreuw A, Wachtveitl J (2007) Carotenoid radical cations as a probe for the molecular mechanism of nonphotochemical quenching in oxygenic photosynthesis. *J Phys Chem B* 111: 3481-3487
- Andersson B, Barber J (1996) Mechanisms of photodamage and protein degradation during photoinhibition of photosystem II. In: Baker NR ed. *Photosynthesis and the Environment*. Kluwer Academic Publ, Dordrecht, pp 101-121
- Andersson J, Walters RG, Horton P, Jansson S (2001) Antisense inhibition of the photosynthetic antenna proteins CP29 and CP26: Implications for the mechanism of protective energy dissipation. *Plant Cell* 13: 1193-1204
- Andersson J, Wentworth M, Walters RG, Howard CA, Ruban AV, Horton P, Jansson S (2003) Absence of the Lhcb1 and Lhcb2 proteins of the light-harvesting complex of photosystem II – effects on photosynthesis, grana stacking and fitness. *The Plant Journal* 35: 350-361
- Anderson JM, Chow WS, Goodchild DJ (1988) Thylakoid membrane organisation in sun/shade acclimation. *Aust J Plant Physiol* 15: 11-26
- Anderson JM, Chow WS, Park YI (1995) The grand design of photosynthesis: acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. *Photosynth Res*; 46: 129-139
- Anderson JM, Osmond B (2001) Sun-shade responses: Compromises between acclimation and photoinhibition. In: Kyle DJ, Osmond B, Arntzen CJ eds. *Photoinhibition*. Elsevier, Amsterdam, pp 1-38
- Arntzen CJ, Ditto CL, Brewer PE (1979) Chloroplast membrane alterations in triazine resistant *Amaranthus retroflexus* biotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 278-282
- Arntzen CJ, Pfister K, Steinback KE (1982) The mechanism of chloroplast triazine resistance: alterations in the site of herbicide action. In: LeBaron HM, Gressel J eds. *Herbicide Resistance in Plants*. John Wiley and Sons, New York, pp 185-214
- Aro EM, Virgin I, Andersson B (1993) Photoinhibition of photosystem II: inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta* 1143: 113-134
- Asada K (1994) Mechanisms for scavenging reactive molecules generated in chloroplasts under light stress. In: Baker NR, Bowyer JR eds. *Photoinhibition of Photosynthesis: From Molecular Mechanisms to the Field*. BIOS Sci Publ, Oxford, pp 129-142
- Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplast: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 601-639
- Assmann SM (1988) Enhancement of the stomatal response to blue light by red light, reduced intracellular concentrations of CO<sub>2</sub>, and low vapor pressure differences. *Plant Physiol*. 87: 226-237
- Avenson TJ, Ahn TK, Zigmantas D, Niyogi KK, Li Z, Ballottari M, Bassi R, Fleming GR (2008) Zeaxanthin radical cation formation in minor light harvesting complexes of higher plant antenna. *J Biol Chem* 283: 3550-3558
- Avenson TJ, Ahn TK, Niyogi KK, Ballottari M, Bassi R, Fleming GR (2009) Lutein can act as a switchable charge-transfer quencher in the CP26 light-harvesting complex. *J Biol Chem* 284: 2830-2835
- Bajkán Sz, Váradi Gy, Balogh M, Domonkos Á, Kiss GyB, Kovács L, Lehoczki E (2010) Conserved structure of the chloroplast-DNA encoded D1 protein is essential for effective photoprotection via non-photochemical thermal dissipation in higher plants. *Mol Genet Genomics* 284: 55-63

- Bajkán Sz, Várkonyi Zs, Lehoczki E (2011) Comparative study on energy partitioning in photosystem II of two *Arabidopsis thaliana* mutants with reduced non-photochemical quenching capacity. *Acta Physiol Plant* (közlésre elfogadva)
- Barber J, Andersson B (1992) Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem Sci* 17: 61-66
- Benhassaine-Kesri G, Aid F, Demandre C, Kader JC, Mazliak P (2002) Drought stress affects chloroplast lipid metabolism in rape (*Brassica napus*) leaves. *Physiol Plant* 115: 221-227
- Bennett J (1977) Phosphorylation of chloroplast membrane proteins. *Nature* 269: 344-346
- Bennett J (1979) Chloroplast phosphoproteins. The protein kinase of thylakoid membranes is light-dependent. *FEBS Lett* 103: 342-344
- Bergantino E, Segalla A, Brunetta A, Teardo E, Rigoni F, Giacometti GM, Szabo I (2003) Light- and pH-dependent structural changes in the PsbS subunit of photosystem II. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15265-15270
- Bernacchia G, Furini A (2004) Biochemical and molecular responses to water stress in resurrection plants. *Physiol Plant* 121: 175-181
- Betterle N, Ballottari M, Zorzan S, de Bianchi S, Cazzaniga S, Dall'Osto L, Morosinotto T, Bassi R (2009) Light induced dissociation of an antenna hetero-oligomer is needed for non-photochemical quenching induction. *J Biol Chem* 284: 15255-15266
- Beverdort WD, Hume DJ, Donnelly-Vanderloo MJ (1988) Agronomic performance of triazine-resistant and susceptible reciprocal spring canola hybrids. *Crop Sci* 28: 932-934
- Bilger W, Björkman O (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in *Hedera canariensis*. *Photosynth Res* 25: 173-185
- Bilger W, Björkman O (1994) Relationships among violaxanthin deepoxidation, thylakoid membrane conformation, and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching in leaves of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Planta* 193: 238-246
- Bilger W, Schreiber U, Bock M (1995) Determination of the quantum efficiency of PS II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia* 102: 425-432
- Björkman O, Demmig B (1987) Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170: 489-504
- Björkman O, Powles SB (1987) Leaf movement in the shade species *Oxalis oregana* L. I. Response to light level and light quality. *Carneg Inst Wash Yearb* 80: 59-62
- Bohnert HJ, Shen B (1999) Transformation and compatible solutes. *Sci Hortic* 78: 237-260
- Bonaventura C, Mayers J (1969) Fluorescence and oxygen evolution from *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochim Biophys Acta* 189: 366-383
- Bonente G, Howes BD, Caffarri S, Smulevich G, Bassi R (2008) Interactions between the photosystem II subunit PsbS and xanthophylls studied in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 283: 8434-8445
- Bota J, Medrano H, Flexas J (2004) Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? *New Phytologist* 162: 671-681
- Bowes JM, Crofts AR, Arntzen CJ (1980) Redox reactions on the reducing side of photosystem II in chloroplasts with altered herbicide binding properties. *Arch Biochem Biophys* 200: 303-308
- Briantais JM, Vernotte C, Picaud M, Krause GH (1979) A quantitative study of the slow decline of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 548: 128-138
- Briantais JM, Ducruet JM, Hodges M, Krause GH (1992) The effects of low temperature acclimation and photoinhibitory treatments on photosystem-2 studied by thermoluminescence and fluorescence decay kinetics. *Photosynth Res* 31: 1-10
- Briantais JM (1994) Light-harvesting chlorophyll a-b complex requirement for regulation of photosystem II photochemistry by non-photochemical quenching. *Photosynth Res* 40: 287-294
- Brugnoli E, Björkman O (1992) Growth of cotton under continuous salinity stress-influence on allocation pattern, stomatal and nonstomatal components of photosynthesis and dissipation of excess light energy. *Planta* 187: 335-47
- Bugos RC, Yamamoto HY (1996) Molecular cloning of violaxanthin de-epoxidase from romaine lettuce and expression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6320-6325

- Bunce JA (1981) Relationships between maximum photosynthetic rates and photosynthetic tolerance of low leaf water potentials. *Can J Bot* 59: 769-774
- Burke JJ, Wilson RF, Swafford JR (1982) Characterization of chloroplasts isolated from triazine-susceptible and triazine-resistant biotypes of *Brassica campestris* L. *Plant Physiol* 70: 24-29
- Caffarri S, Croce R, Breton J, Bassi R (2001) The major antenna complex of photosystem II has a xanthophyll binding site not involved in light harvesting. *J Biol Chem* 276: 35924-35933
- Caldwell CR, Whitman CE (1987) Temperature-induced protein conformational changes in barley root plasma membrane-enriched microsomes. I. Effect of temperature on membrane protein and lipid mobility. *Plant Physiol* 84: 918-923
- Cailly AL, Rizza F, Genty B, Harbinson J (1996) Fate of excitation at PS II in leaves. The non-photochemical side. *Plant Physiol Biochemistry Special issue*, pp 86
- Castrillo M, Fernández D, Calcagno AM, Trujillo I, Guenni L (2001) Responses of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, protein content, and stomatal conductance to water deficit in maize, tomato, and bean. *Photosynthetica* 39: 221-226
- Chaves MM (1991) Effects of water deficits on carbon assimilation. *J Exp Bot* 42: 1-16
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS (2003) Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Funct Plant Biol* 30: 239-264
- Chaves MM, Oliveira MM (2004) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *J Exp Bot* 55: 2365-2384
- Chow WS, Anderson JM, Hope AB (1988) Variable stoichiometries of photosystem-II to photosystem-I reaction centers. *Photosynth Res* 17: 277-281
- Chow WS (1994) Photoprotection and photoinhibitory damage. In: Bittar EE, Barber J eds. *Advances in Molecular and Cell Biology*, Vol 10. JAI Press, London, pp 151-196
- Cornic G, Gouallec JL, Briantais JM, Hodges M (1989) Effect of dehydration and high light on photosynthesis of two C<sub>3</sub> plants (*Phaseolus vulgaris* L. and *Elatostema repens* (Lour.) Hall f.). *Planta* 177: 84-90
- Cornic G, Briantais JM (1991) Partitioning of photosynthetic electron flow between CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> reduction in a C<sub>3</sub> leaf (*Phaseolus vulgaris* L.) at different CO<sub>2</sub> concentrations and during drought stress. *Planta* 183: 178-184
- Cornic G, Fresneau S (2002) Photosynthetic carbon reduction and carbon oxidation cycles are the main electron sinks for photosystem II activity during a mild drought. *Ann Bot* 89: 887-894
- Crouchman S, Ruban AV, Horton P (2006) PsbS enhances nonphotochemical fluorescence quenching in the absence of zeaxanthin. *FEBS Lett* 580: 2053-2058
- Curviel VB, van Rensen JJS (1993) Influence of photoinhibition on electron transport and photophosphorylation of isolated chloroplasts. *Physiol Plant* 89: 97-102
- da Silva JM, Arrabaça MC (2004) Contributions of soluble carbohydrates to the osmotic adjustment in the C<sub>4</sub> grass *Setaria sphacelata*: a comparison between rapidly and slowly imposed water stress. *J Plant Physiol* 161: 551-555
- Darkó É, Váradi Gy, Hargitai A, Nagy E, Lehoczki E (1995) Comparison of photosensitivity of the photosynthetic apparatus in different light adapted atrazine-resistant and susceptible biotypes from *Conyza canadensis* (L.) Cronq. In: Mathis P ed. *Photosynthesis from light to Biosphere*, Vol IV. Kluwer Academic Publ, Dordrecht/Boston/London, pp 191-194
- Darkó É, Váradi Gy, Lehoczki E (1996) Atrazine-resistant biotypes of *Conyza canadensis* have altered fluorescence quenching and xanthophyll cycle pattern. *Plant Physiol Biochem* 34: 843-852
- Darkó É, Váradi Gy, Lemoine Y, Lehoczki E (2000) Defensive strategies against high-light stress in wild and D1 protein mutant biotypes of *Erigeron canadensis*. *Aust J Plant Physiol* 27: 325-333
- Darmency H, Pernes J (1989) Agronomic performance of a triazine-resistant foxtail millet (*Setaria italica* (L.) Beauv.). *Weed Res* 29: 147-150
- Davies WJ, Zhang J (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plant in drying soil. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 55-76
- de Bianchi S, Dall'Osto L, Tognon G, Morosinotto T, Bassi R (2008) Minor antenna proteins CP24 and CP26 affect the interactions between photosystem II subunits and the electron transport rate in grana membranes of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 1012-1028

- Demmig B, Winter K, Krüger A, Czygan FC (1987) Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves: a possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. *Plant Physiol* 84: 218-224
- Demmig-Adams B (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim Biophys Acta* 1020: 1-24
- Demmig-Adams B, Adams WWIII (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 599-626
- Demmig-Adams B, Adams WWIII (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci* 1: 21-26
- Demmig-Adams B, Adams WW, Barker DH, Logan BA, Bowling DR, Verhoeven AS (1996) Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiol Plant* 98: 253-264
- Dominici P, Caffarri S, Armenante F, Ceoldo S, Crimi M, Bassi R (2002) Biochemical properties of the PsbS subunit of photosystem II either purified from chloroplast or recombinant. *J Biol Chem* 277: 22750-22758
- Dreuw A, Wormit M (2008) Simple replacement of violaxanthin by zeaxanthin in LHCII does not cause chlorophyll fluorescence quenching. *J Inorg Biochem* 102: 458-465
- Ducruet J, Lemoine Y (1985) Increased heat sensitivity of the photosynthetic apparatus in triazine-resistant biotypes from different plant species. *Plant Cell Physiol* 26: 419-429
- Ducruet JM, Roman M, Ortega JM, Janda T (2005) Role of the oxidized secondary acceptor Q<sub>B</sub> of photosystem II in the delayed 'afterglow' chlorophyll luminescence. *Photosynth Res* 84: 161-166
- El-Lithy ME, Rodrigues GC, van Rensen JJS, Snel JF, Dassen HJ, Koornneef M, Jansen MA, Aarts MG, Vreugdenhil D (2005) Altered photosynthetic performance of a natural Arabidopsis accession is associated with atrazine resistance. *J Exp Bot* 56: 1625-1634
- Farquhar GD, Sharkey TD (1982) Stomatal conductance and photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol* 33: 317-345
- Farquhar GD, von Caemmerer S, Berry JA (1990) A biochemical model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of C<sub>3</sub> species. *Planta* 149: 78-90
- Färber A, Young AJ, Ruban AV, Horton P, Jahns P (1997) Dynamics of xanthophyll-cycle activity in different antenna subcomplexes in the photosynthetic membranes of higher plants. *Plant Physiol* 115: 1609-1618
- Fedtko C (1979) Physiological responses of soybean (*Glycine max*) plants to metribuzin. *Weed Sci* 27: 192-195
- Feild TS, Lee DW, Holbrook NM (2001) Why leaves turn red in autumn: the role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood. *Plant Physiol* 127: 566-574
- Finazzi G, Johnson GN, Dall'Osto L, Joliot P, Wollman FA, Bassi R (2004) A zeaxanthin-independent nonphotochemical quenching mechanism localized in the photosystem II core complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 12375-12380
- Flexas J, Medrano H (2002) Drought inhibition of photosynthesis in C<sub>3</sub> plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Ann Bot* 89: 183-189
- Flexas J, Bota J, Loreto F, Cornic G, Sharkey TD (2004) Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C<sub>3</sub> plants. *Plant Biology* 6: 269-279
- Flexas J, Ribas-Carbó M, Bota J, Galmés J, Henkle M, Martínez-Cañellas S, Medrano H (2006) Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO<sub>2</sub> concentration. *New Phytologist* 172: 73-82
- Flexas J, Diaz-Espejo A, Galmés J, Kaldenhoff R, Medrano H, Ribas-Carbo M (2007) Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO<sub>2</sub> concentration around leaves. *Plant Cell Environ* 30: 1284-1298
- Flexas J, Ribas-Carbó M, Diaz-Espejo A, Galmés J, Medrano H (2008) Mesophyll conductance to CO<sub>2</sub>: current knowledge and future prospects. *Plant Cell Environ* 31: 602-612
- Foyer CH, Descourvières P, Kunert KJ (1994) Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ* 17: 507-523

- Frank HA, Bautista JA, Josue JS, Young AJ (2000) Mechanism of nonphotochemical quenching in green plants: energies of the lowest excited singlet states of violaxanthin and zeaxanthin. *Biochemistry* 39: 2831-2837
- Fuerst EP, Norman MA (1991) Interaction of herbicides with photosynthetic electron transport. *Weed Sci* 39: 458-464
- Funk C, Schröder WP, Napiwotzki A, Tjus SE, Renger G, Andersson B (1995) The PSII-S protein of higher plants: a new type of pigmentbinding protein. *Biochemistry* 34: 11133-11141
- Gal A, Shahak Y, Schuster G, Ohad I (1987) Specific loss of LHCII phosphorylation in the *Lemna* mutant-1073 lacking the cytochrome-b6/f complex. *FEBS Lett* 221: 205-210
- Ganeteg U, Strand A, Gustafsson P, Jansson S (2001) The properties of the chlorophyll a/b binding proteins Lhca2 and Lhca3 studied in vivo using antisense inhibition. *Plant Physiol* 12: 150-158
- Gawronski SW, Sugita M, Sugiura M (1992) Mutation of *psbA* gene in herbicide-resistant population of *Erigeron canadensis*. In: Murata N ed. *Research in Photosynthesis*, Vol III. Kluwer Academic Publ, Dordrecht, pp 405-407
- Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 990: 87-92
- Genty B, Goulas Y, Dimon B, Peltier G, Briantais JM, Moya I (1992) Modulation of efficiency of primary conversion in leaves. *Photosynth Res* 34: 106
- Genty B, Harbinson J (1996) Regulation of light utilization for photosynthetic electron transport. In: Baker NR ed. *Photosynthesis and the environment*. Kluwer Academic Publ, Amsterdam, pp 67-99
- Genty B, Meyer S, Piel C, Badeck F, Liozon R (1998) CO<sub>2</sub> diffusion inside leaf mesophyll of ligneous plants. In: Garab G ed. *Photosynthesis: mechanisms and effects*. Kluwer Academic Publ, Dordrecht, pp 3961-3967
- Girardi MT, Cona B, Geiken B, Kucera T, Masojidek J, Matoo A K (1996) Longterm drought stress induces structural and functional reorganization of photosystem II. *Planta* 199: 118-125
- Gilmore AM, Yamamoto HY (1992) Dark induction of zeaxanthin dependent nonphotochemical fluorescence quenching mediated by ATP. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1899-1903
- Golding AJ, Johnson GN (2003) Down-regulation of linear and activation of cyclic electron transport during drought. *Planta* 218: 107-114
- Gollan T, Passioura JB, Munns R (1986) Soil water status affects the stomatal conductance of fully turgid wheat and sunflower leaves. *Aust J Plant Physiol* 13: 459-464
- Gonzales J, Pastenes C, Horton P (2001) Effect of temperature, water and light stresses on PS2 heterogeneity in four bean varieties (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Revista Chilena Historia Natural* 74: 779-791
- Goss R, Opitz C, Lepetit B, Wilhelm C (2008) The synthesis of NPQ-effective zeaxanthin depends on the presence of a transmembrane proton gradient and slightly basic stromal side of the thylakoid membrane. *Planta* 228: 999-1009
- Graber P (1987) Primary charge separation and energy transduction in photosynthesis. In: Molazzo G, Blanks M eds. *Bioelectrochemistry*. Plenum, New York, pp 379-429
- Gressel J (1985) Herbicide tolerance and resistance; alteration of site of activity. In: Duke SO ed. *Weed Physiology*, Vol II. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 159-189
- Gressel J, Ben-Sinai G (1985) Low intraspecific competitive fitness in a triazine-resistant, nearly nuclear-isogenic line of *Brassica napus*. *Plant Sci* 38: 29-32
- Gronwald JW (1994) Resistance to photosystem II inhibiting herbicides. In: Powles SB, Holtum JAM eds. *Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry*. Lewis Publ, Boca Raton, pp 299-316
- Haehnel W (1984). Photosynthetic electron transport in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 35: 659-693
- Hart JJ, Stemler A (1990) High light-induced reduction and low light-enhanced recovery of photon yield in triazine-resistant *Brassica napus*. *Plant Physiol* 94: 1301-1307
- Härtel H, Lokstein H (1995) Relationship between quenching of maximum and dark-level chlorophyll fluorescence in vivo: dependence on photosystem II antenna size. *Biochim Biophys Acta* 1228: 91-94
- Härtel H, Lokstein H, Grimm B, Rank B (1996) Kinetic studies on the xanthophyll cycle in barley leaves. *Plant Physiol* 110: 471-482

- Haupt-Herting S, Fock HP (2002) Oxygen exchange in relation to carbon assimilation in water stressed leaves during photosynthesis. *Ann Bot* 89: 851-854
- Havaux M (1989) Comparison of atrazine-resistant and -susceptible biotypes of *Senecio vulgaris* L: Effect of high and low temperatures on the *in vivo* photosynthetic electron transfer in intact leaves. *J Exp Bot* 40: 849-854
- Havaux M, Dall'Osto L, Cuine S, Giuliano G, Bassi R (2004) The effect of zeaxanthin as the only xanthophyll on the structure and function of the photosynthetic apparatus in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 279: 13878-13888
- He JX, Wang J, Liang HG (1995) Effects of water-stress on photochemical function and protein-metabolism of photosystem-II in wheat leaves. *Physiol Plant* 93: 771-777
- Heber U, Walker D (1992) Concerning a dual function of coupled cyclic electron transport in leaves. *Plant Physiol* 100: 1621-1626
- Hendrickson L, Furbank RT, Chow WS (2004) A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. *Photosynth Res* 82: 73-81
- Hirschberg J, Bleecker A, Kyle DJ, McIntosh L, Arntzen CJ (1984) The molecular basis of triazine-herbicide resistance in higher-plant chloroplasts. *Z Naturforsch* 39c: 412-420
- Hirschberg J, McIntosh L (1983) The molecular basis of herbicide resistance in *Amaranthus hybridus*. *Science* 222: 1346-1349
- Holt JS, Stemler AJ, Radosevic SR (1981) Differential light responses of photosynthesis by triazine-resistant and triazine-susceptible *Senecio vulgaris* biotypes. *Plant Physiol* 67: 744-748
- Holt JS, Goffner DP (1985) Leaf structure and function in triazine-resistant common groundsel (*Senecio vulgaris*). *Plant Physiol* 79: 699-705
- Holt NE, Zigmantas D, Valkunas L, Li XP, Niyogi KK, Fleming GR (2005) Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting. *Science* 307: 433-436
- Horton P (1981) The effect of redox potential on the kinetics of fluorescence induction in peachloroplasts 2. sigmoidicity. *Biochim Biophys Acta* 637: 152-158
- Horton P, Hague A (1988) Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts. IV. Resolution of nonphotochemical quenching. *Biochim Biophys Acta* 932: 107-115
- Horton P, Ruban AV, Rees D, Pascal AA, Noctor G, Young AJ (1991) Control of the light-harvesting function of chloroplast membranes by aggregation of the LHCII chlorophyll-protein complex. *FEBS Lett* 292: 1-4
- Horton P, Ruban AV (1993) Delta-pH-dependent quenching of the Fo-level of chlorophyll fluorescence in spinach leaves. *Biochim Biophys Acta* 1142: 203-206
- Horton P, Ruban AV, Walters RG (1994) Regulation of light harvesting in green plants: indication by nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol* 106: 415-420
- Horton P, Ruban AV, Walters RG (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 665-684
- Horton P, Ruban AV, Wentworth M (2000) Allosteric regulation of the light harvesting system of photosystem II. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355: 1361-1370
- Horton P, Wentworth M, Ruban A (2005) Control of the light harvesting function of chloroplast membranes: The LHCII-aggregation model for non-photochemical quenching. *FEBS Lett* 579: 4201-4206
- Horton P, Johnson MP, Pérez-Bueno M, Kiss AZ, Ruban AV (2008) Does the structure and macro-organization of photosystem II in higher plant grana membranes regulate light harvesting states? *FEBS J* 275: 1069-1079
- Hurry V, Anderson JM, Badger MR, Price GD (1996) Reduced levels of cytochrome *b6/f* in transgenic tobacco increases the excitation pressure on photosystem II without increasing the sensitivity to photoinhibition *in vivo*. *Photosynth Res* 50: 159-69
- Ilioaia C, Johnson M, Horton P, Ruban AV (2008) Induction of efficient energy dissipation in the isolated light harvesting complex of photosystem II in the absence of protein aggregation. *J Biol Chem* 283: 29505-29512
- Ireland CR, Telfer A, Covello PS, Baker NR, Barber J (1988) Studies on the limitations to photosynthesis in leaves of the herbicide-resistant mutant of *Senecio vulgaris* L. *Planta* 173: 459-467

- Ivanov AG, Sane PV, Hurry V, Öquist G, Huner NPA (2008) Photosystem II reaction centre quenching: mechanisms and physiological role. *Photosynth Res* 98: 565-574
- Jansson S (1999) A guide to the *Lhc* genes and their relatives in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 4: 236-240
- Johnson MP, Pérez-Bueno ML, Zia A, Horton P, Ruban AV (2009) The zeaxanthin-independent and zeaxanthin-dependent qE components of nonphotochemical quenching involve common conformational changes within the photosystem II antenna in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 149: 1061-1075
- Johnson MP, Ruban AV (2010) *Arabidopsis* plants lacking PsbS protein possess photoprotective energy dissipation. *Plant J* 61: 283-289
- Jung HS, Niyogi KK (2009) Quantitative genetic analysis of thermal dissipation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 150: 997-986
- Kalituho L, Grasses T, Graf M, Rech J, Jahns P (2006) Characterization of a nonphotochemical quenching-deficient *Arabidopsis* mutant possessing an intact PsbS protein, xanthophyll cycle and lumen acidification. *Planta* 223: 532-541
- Kato MC, Hikosaka K, Hirotsu N, Makino A, Hirose T (2003) The excess light energy that is neither utilized in photosynthesis nor dissipated by photoprotective mechanisms determines the rate of photoinactivation in photosystem II. *Plant Cell Physiol* 44: 318-325
- Kiss A, Ruban AV, Horton P (2008) The PsbS protein controls the organization of the photosystem II antenna in higher plant thylakoid membranes. *J Biol Chem* 283: 3972-3978
- Kloppstech K (1997) Light regulation of photosynthetic genes. *Physiol Plant* 100: 739-747
- Klughammer C, Schreiber U (2008) Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the saturation pulse method. *PAM Application Notes* 1: 27-35
- Kohno H, Ohki A, Ohki S, Koizumi K, Van den Noort ME, Rodrigues GC, van Rensen JJ, Wakabayashi K (2000) Low resistance against novel benzylamino-1,3,5-triazine herbicides in atrazine-resistant *Chenopodium album* plants. *Photosynth Res* 65: 115-120
- Kovács L, Damkjær J, Kerešice S, Iliaia C, Ruban AV, Boekema EJ, Jansson S, Horton P (2006) Lack of the light-harvesting complex CP24 affects the structure and function of the grana membranes of higher plant chloroplasts. *Plant Cell* 18: 3106-3120
- Krause GH (1988) Photoinhibition of photosynthesis: an evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiol Plant* 74: 566-574
- Krivoshcheva A, Tao DL, Ottander C, Wingsle G, Dube SL, Öquist G (1996) Cold acclimation and photoinhibition of photosynthesis in Scots pine. *Planta* 200: 296-305
- Kuiper PJC (1980) Lipid metabolism as a factor in environmental adaptation. In: Mazliak P, Benveniste P, Costes C, Douce R eds. *Biogenesis and function of plant lipids*. Elsevier, Amsterdam, pp 169-176
- Külheim C, Ågren J, Jansson S (2002) Rapid regulation of light harvesting and plant fitness in the field. *Science* 297: 91-93
- Kyle DJ (1987) The biochemical basis for photoinhibition of photosystem II. In: Kyle DJ, Osmond CB, Arntzen CJ eds. *Photoinhibition*. Elsevier, Amsterdam, pp 197-226
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lambrev PH, Nilkens M, Miloslavina Y, Jahns P, Holzwarth AR (2010) Kinetic and spectral resolution of multiple nonphotochemical quenching components in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* 152: 1611-1624
- Lawlor DW (2002) Limitations to Photosynthesis in water-stressed leaves: stomatal vs. metabolism and the role of ATP. *Ann Bot* 89: 871-885
- Lawlor DW, Cornic G (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ* 25: 275-294
- Lehoczki E, Pölös E, Laskay G, Farkas T (1985) Chemical compositions and physical states of chloroplast lipids related to atrazine resistance in *Conyza canadensis*. *Plant Sci* 42: 19-24
- Lemoine Y, Dubacq JP, Zabulon G, Ducruet JM (1986) Organization of the photosynthetic apparatus from triazine-resistant and -susceptible biotypes of several plant species. *Can J Bot* 64: 2999-3007
- Li XP, Björkman O, Shih C, Grossman AR, Rosenquist M, Jansson S, Niyogi KK (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* 403: 391-395

- Li XP, Phippard A, Pasari J, Niyogi KK (2002a) Structure-function analysis of photosystem II subunit S (PsbS) in vivo. *Funct Plant Biol* 29: 1131-1139
- Li XP, Muller-Moule P, Gilmore AM, Niyogi KK (2002b) PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15222-15227
- Li XP, Gilmore AM, Caffarri S, Bassi R, Golan T, Kramer D, Niyogi KK (2004) Regulation of photosynthetic light harvesting involves intrathylakoid lumen pH sensing by the PsbS protein. *J Biol Chem* 279: 22866-22874
- Li Z, Ahn TK, Avenson TJ, Ballotari M, Cruz JA, Kramer DM, Bassi R, Fleming GR, Keasling JD, Niyogi KK (2009) Lutein accumulation in the absence of zeaxanthin restores nonphotochemical quenching in the *Arabidopsis thaliana* npq1 mutant. *Plant Cell* 21: 1798-1812
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic Biomembranes. In: Packer L, Douce R eds. *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, 148: 350-382
- Liu ZF, Yan HC, Wang KB, Kuang TY, Zhang JP, Gui LL, An XM, Chang WR (2004) Crystal structure of spinach major-light harvesting complex at 2.72Å resolution. *Nature* 428: 287-292
- Lokstein H, Tian L, Polle JEW, DellaPenna D (2002) Xanthophyll biosynthetic mutants of *Arabidopsis thaliana*: altered nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence is due to changes in photosystem II antenna size and stability. *Biochim Biophys Acta* 1553: 309-319
- Long SP, Humphries S, Falkowski PG (1994) Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Plant Physiol Plant Mol Biol* 45: 633-662
- Matsubara S, Gilmore AM, Osmond CB (2001) Diurnal and acclimatory responses of violaxanthin and lutein epoxide in the Australian mistletoe *Amyema miquelii*. *Aust J Plant Physiol* 28: 793-800
- McCloskey WB, Holt JS (1990) Triazine resistance in *Senecio vulgaris* parental and nearly isonuclear backcrossed biotypes is correlated with reduced productivity. *Plant Physiol* 92: 954-962
- Melis A (1985) Functional properties of PS II $\beta$  in spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 808: 334-342
- Melis A (1991) Dynamics of photosynthetic membrane-composition and function. *Biochim Biophys Acta* 1058: 187-106
- Meyer S, Genty B (1998) Mapping intercellular CO<sub>2</sub> mole fraction (C<sub>i</sub>) in *Rosa rubiginosa* leaves fed with abscisic acid by using chlorophyll fluorescence imaging: significance of C<sub>i</sub> estimated from leaf gas exchange. *Plant Physiol* 116: 947-957
- Miloslavina Y, Wehner A, Wientjes E, Reus M, Lambrev P, Garab G, Croce R, Holzwarth AR (2008) Far-red fluorescence: a direct spectroscopic marker for LHCII oligomers forming in non photochemical quenching. *FEBS Lett* 582: 3625-3631
- Miyake C, Shinzaki Y, Miyata M, Tomizawa K (2004) Enhancement of cyclic electron flow around PSI at high light and its contribution to the induction of non-photochemical quenching of chl fluorescence in intact leaves of tobacco plants. 45 :1426-1433
- Mozzo M, Passarini F, Bassi R, van Amerongen H, Croce R (2008) Photoprotection in higher plants: the putative quenching site is conserved in all outer light-harvesting complexes of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1777: 1263-1267
- Mullet JE (1983) The amino-acid-sequence of the polypeptide segment which regulates membrane adhesion (grana stacking) in chloroplasts. *J Biol Chem* 258: 9941-9948
- Mullineaux CW, Ruban AV, Horton P (1994) Prompt heat release associated with delta-pH dependent quenching in spinach thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1185: 119-123
- Munekage Y, Hashimoto M, Miyake C, Tomizawa K, Endo T, Tasaka M, Shikanai T (2004) Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. 429: 579-582
- Murata N, Takahashi S, Nishiyama Y, Allakhverdiev SI (2007) Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim Biophys Acta* 1767: 414-421
- Niyogi KK, Björkman O, Grossman AR (1997) *Chlamydomonas* xanthophyll cycle mutants identified by video imaging of chlorophyll fluorescence quenching. *Plant Cell* 9: 1369-1380
- Niyogi KK, Grossman AR, Björkman O (1998) *Arabidopsis* mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* 10: 1121-1134
- Niyogi KK (1999) Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 333-359

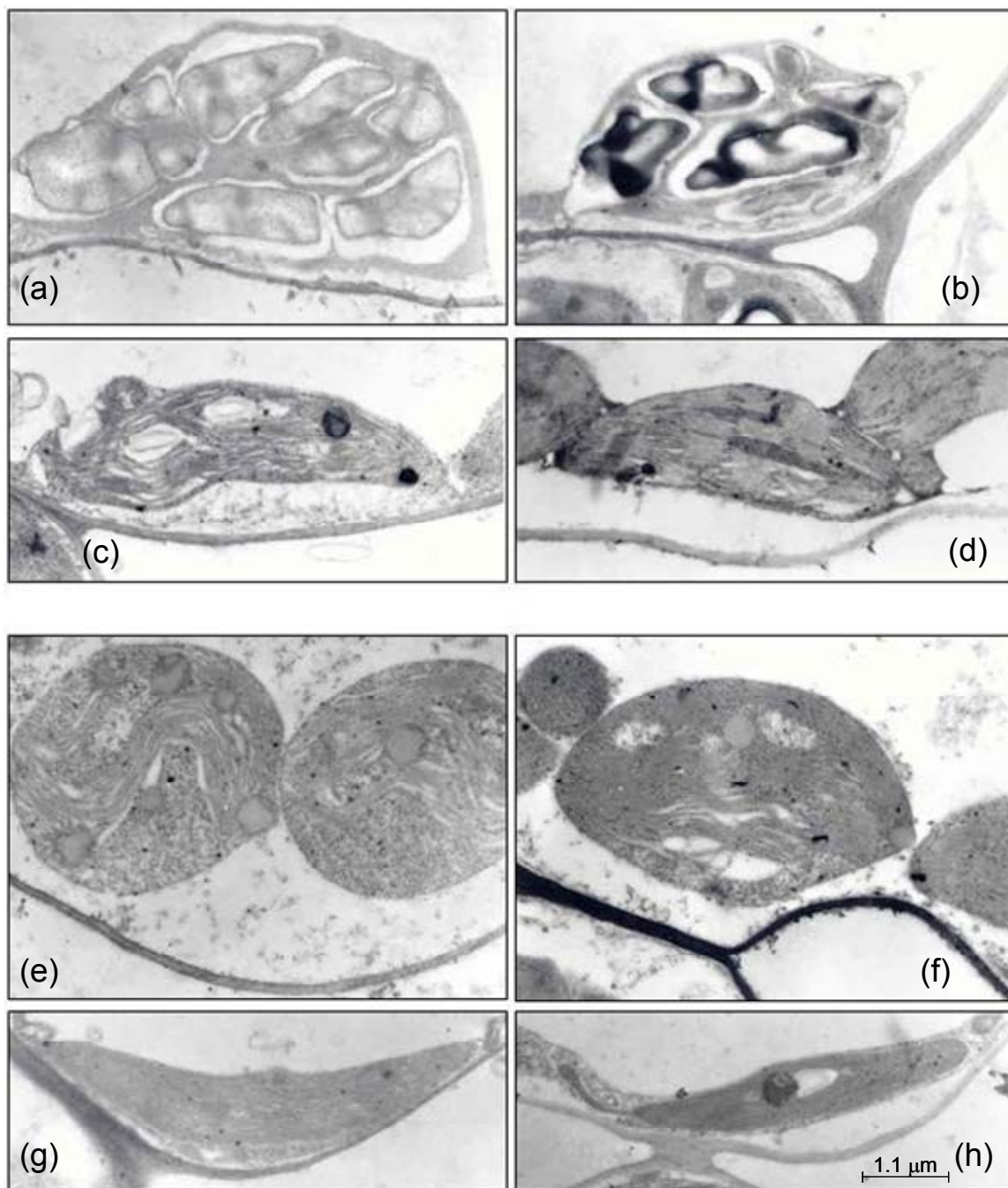
- Niyogi KK (2000) Safety valves for photosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 3: 455-460
- Niyogi KK, Shih C, Chow SW, Pogson BJ, DellaPenna D, Björkman O (2001) Photoprotection in a zeaxanthin- and lutein-deficient double mutant of *Arabidopsis*. *Photosynth Res* 67: 139-145
- Niyogi KK, Li XP, Rosenberg V, Jung HS (2005) Is PsbS the site of nonphotochemical quenching in photosynthesis? *J Exp Bot* 56: 375-382
- Noctor G, Ruban AV, Horton P (1993) Modulation of delta-pH-dependent nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence in spinach-chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 1183: 339-344
- Noctor G, Veljovic-Jovanovic S, Driscoll S, Novitskaya L, Foyer CH (2002) Drought and oxidative load in the leaves of C-3 plants: a predominant role for photorespiration? *Ann Bot* 89: 841-850
- Ort DR, Ahrens WH, Martin B, Stoller EW (1983) Comparison of photosynthetic performance in triazine-resistant and susceptible biotypes of *Amaranthus hybridus*. *Plant Physiol* 72: 925-930
- Ort DR (2001) When there is too much light. *Plant Physiol* 125: 29-32
- Osmond CB, Grace SC (1995) Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? *J Exp Bot* 46: 1351-1362
- Oxborough K, Horton P (1988) A study of the regulation and function of energy-dependent quenching in pea-chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 934: 135-143
- Ögren E, Öquist G (1985) Effects of drought on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition susceptibility in intact willow leaves. *Planta* 166: 380-388
- Ögren E, Sjöström M (1990) Estimation of the effect of photoinhibition on the carbon gain in leaves of a willow canopy. *Planta* 181: 560-567
- Ögren E, Rosenqvist E (1992) On the significance of photoinhibition of photosynthesis in the field and its generality among species. *Photosynth Res* 33: 63-71
- Parry MAJ, Andralojc PJ, Khan S, Lea PJ, Keys AJ (2002) Rubisco activity: effects of drought stress. *Ann Bot* 89: 833-839
- Peterson RB, Havir EA (2000) A nonphotochemical-quenching-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* possessing normal pigment composition and xanthophyll-cycle activity. *Planta* 210: 205-214
- Pfister K, Arntzen CJ (1979) The mode of action of photosystem II-specific inhibitors in herbicide-resistant weed biotypes. *Z Naturforsch* 34c: 996-1009
- Pfündel E, Renganathan M, Gilmore AM, Yamamoto HY, Dilley RA (1994) Intrathylakoid pH in isolated pea chloroplasts as probed by violaxanthin de-epoxidation. *Plant Physiol* 106: 1647-1658
- Polle A (1997) Defense against photooxidative damage in plants. In: Scandalios JG ed. *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbor Lab Press, Plainview, NY, pp 623-666
- Pogson BJ, Niyogi KK, Björkman O, DellaPenna D (1998) Altered xanthophyll compositions adversely affect chlorophyll accumulation and non-photochemical quenching in *Arabidopsis* mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13324-13329
- Pogson BJ, Rissler HM (2000) Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis and photoprotection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355: 1395-1403
- Powles SB, Björkman O (1982) Photoinhibition of photosynthesis: effect on chlorophyll fluorescence at 77K in intact leaves and in chloroplast membranes of *Nerium oleander*. *Planta* 156: 97-107
- Quick WP, Stitt M (1989) An examination of factors contributing to nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence in barley leaves. *Biochim Biophys Acta* 977: 287-296
- Renou JL, Gerbaud A, Just D, André M (1990) Differing substomatal and chloroplastic CO<sub>2</sub> concentrations in water-stressed wheat. *Planta* 183: 415-419
- Riera M, Valon C, Fenzi F, Giraudat J, Leung J (2005) The genetics of adaptive responses to drought stress: abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent signalling components. *Physiol Plant* 123: 111-119
- Ruban AV, Rees D, Noctor GD, Young A, Horton P (1991) Long-wavelength chlorophyll species are associated with amplification of high-energy-state excitation quenching in higher-plants. *Biochim Biophys Acta* 1059: 355-360
- Ruban AV, Horton P, Young AJ (1993a) Aggregation of high plant xanthophylls: differences in absorption spectra and in the dependency on solvent polarity. *J Photochem Photobiol B Biol* 21: 229-234

- Ruban AV, Young AJ, Horton P (1993b) Induction of non-photochemical quenching and absorbance changes in leaves. *Plant Physiol* 102: 741-750
- Ruban AV, Young AJ, Horton P (1994) Modulation of chlorophyll fluorescence quenching in isolated light-harvesting complex of photosystem-II. *Biochim Biophys Acta* 1186: 123-127
- Ruban AV, Horton P (1995) Regulation of nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence in plants. *Aust J Plant Physiol* 22: 221-230
- Ruban AV, Young AJ, Horton P (1996) Dynamic properties of the minor chlorophyll a/b binding proteins of higher plants: an in vitro model for photoprotective nonphotochemical energy dissipation. *Biochemistry* 35: 674-678
- Ruban AV, Horton P (1999) The xanthophyll cycle modulates the kinetics of non-photochemical energy dissipation in isolated light-harvesting complexes, intact chloroplasts and leaves of spinach. *Plant Physiol* 119: 531-542
- Ruban AV, Lee PJ, Wentworth M, Young AJ, Horton P (1999) Determination of the stoichiometry and strength of binding of xanthophylls to the PSII light harvesting complexes. *J Biol Chem* 274: 10458-10465
- Ruban AV, Pascal AA, Lee PJ, Robert B, Horton P (2002a) Molecular configuration of xanthophyll cycle carotenoids in photosystem II antenna complexes. *J Biol Chem* 277: 42937-42942
- Ruban AV, Pascal AA, Robert B, Horton P (2002b) Activation of zeaxanthin is an obligatory event in the regulation of photosynthetic light harvesting. *J Biol Chem* 277: 7785-7789
- Ruban AV, Wentworth M, Yakushevska AE, Andersson J, Lee PJ, Keegstra W, Dekker JP, Boekema EJ, Jansson S, Horton P (2003) Plants lacking the main light-harvesting complex retain photosystem II macro-organization. *Nature* 421: 648-653
- Ruban AV, Berera R, Iliaia C, van Stokkum IHM, Kennis JTM, Pascal AA, van Amerongen H, Robert B, Horton P, van Grondelle R (2007) Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. *Nature* 450: 575-578
- Sahsah Y, Campos P, Gareil M, Zuily-Fodil A, Pham-Thi T (1998) Enzymatic degradation of polar lipids in *Vigna unguiculata* leaves and influence of drought stress. *Physiol Plant* 104: 577-586
- Schansker G, van Rensen JJS (1999) Performance of active photosystem II centers in photoinhibited pea leaves. *Photosynth Res* 62: 175-184
- Schansker G, Tóth SZ, Strasser RJ (2006) Dark recovery of the Chl *a* fluorescence transient (OJIP) after light adaptation: The qT-component of non-photochemical quenching is related to an activated photosystem I acceptor side. *Biochim Biophys Acta* 1757: 787-797
- Schindler C, Lichtenthaler HK (1994) Is there a correlation between light-induced zeaxanthin accumulation and quenching of variable chlorophyll *a* fluorescence? *Plant Physiol Biochem* 32: 813-823
- Schönfeld M, Yaacoby T, Michael O, Rubin B (1987) Triazine resistance without reduced vigor in *Phalaris paradoxa*. *Plant Physiol* 83: 329-333
- Schreiber U (1986) Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer. *Photosynth Res* 9: 261-272
- Schreiber U, Bilger W, Neubauer C (1994) Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze ED, Caldwell MM eds. *Ecophysiology of Photosynthesis*. Springer-Verlag, Berlin, pp 49-70
- Schulze ED (1986) Whole-plant responses to drought. *Aust J Plant Physiol* 13: 127-141
- Somersalo S, Krause GH (1988) Changes in chlorophyll fluorescence related to photoinhibition of photosynthesis and cold acclimation of green plants. In: Lichtenthaler HK ed. *Applications of Chlorophyll Fluorescence*. Kluwer Academic Publ, Dordrecht, pp 157-164
- Souza Machado V, Bandeen JD, Stephenson GR, Lavigne P (1978) Uniparental inheritance of chloroplast atrazine tolerance in *Brassica campestris*. *Can J Plant Sci* 58: 977-981
- Srivastava A, Strasser RJ, Govindjee (1995) Polyphasic rise of chlorophyll *a* fluorescence in herbicide-resistant D1 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth Res* 43: 131-141
- Stowe AE, Holt JS (1988) Comparison of triazine-resistant and -susceptible biotypes of *Senecio vulgaris* and their F1 hybrids. *Plant Physiol* 87: 183-189

- Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Mohanty P, Yunus M, Pathre U eds. Probing Photosynthesis Mechanism, Regulation and Adaptation. Taylor and Francis, London, pp 445-480
- Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Srivastava A (2004) Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: Papageorgiou GC, Govindjee, eds. Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration series, Vol 19. Kluwer Academic Publ, Rotterdam, pp 321-362
- Sundblad LG, Schröder WP, Akerlung HE (1988) S-state distribution and redox state of Q<sub>A</sub> in barley in relation to luminescence decay kinetics. Biochim Biophys Acta 973: 47-52
- Sundby C, Chow WS, Anderson JM (1993a) Effects on photosystem II function, photoinhibition, and plant performance of the spontaneous mutation of Serine-264 in the photosystem II reaction center D1 protein in triazine-resistant *Brassica napus* L. Plant Physiol 103: 105-113
- Sundby C, McCaffery S, Chow WS, Anderson JM (1993b) Photosystem II function, photoinhibition and turnover of the D1 protein at different irradiances in normal and atrazine-resistant plants with an altered Q<sub>B</sub>-binding site In: Murata N ed. Research in photosynthesis, Vol IV. Kluwer Academic Publ, Dordrecht, pp 443-447
- Suss KH, Yordanov I (1986) Biosynthetic cause of in vivo acquired thermotolerance of photosynthetic light reactions and metabolic responses of chloroplasts to heat stress. Plant Physiol 81: 192-199
- Szigeti Z, Lehoczi E (2003) A review of physiological and biochemical aspects of resistance to atrazine and paraquat in Hungarian weeds. Pest Manag Sci 59: 451-458
- Tambussi EA, Casadesus J, Munné-Bosch S, Araus JL (2002) Photoprotection in water-stressed plants of durum wheat (*Triticum turgidum* var. *durum*): Changes in chlorophyll fluorescence, spectral signature and photosynthetic pigments. Funct Plant Biol 29: 35-44
- Teardo E, Polverino de Laureto P, Bergantino E, Dalla Vecchia F, Rigoni F, Szabó I, Giacometti GM (2007) Evidences for interaction of PsbS with photosynthetic complexes in maize thylakoids. Biochim Biophys Acta 1767: 703-711
- Tenhunen JD, Lange OL, Gebel J, Beyschlag W, Weber JA (1984) Changes in photosynthetic capacity, carboxylation efficiency, and CO<sub>2</sub> compensation point associated with midday stomatal closure and midday depression of net CO<sub>2</sub> exchange of leaves of *Quercus suber*. Planta 162: 193-203
- Tezara W, Mitchell VJ, Driscoll SD, Lawlor DW (1999) Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. Nature 401: 914-917
- Tezara W, Mitchell VJ, Driscoll SD, Lawlor DW (2002) Effects of water deficit and its interactions with CO<sub>2</sub> supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. J Exp Bot 53: 1781-1791
- Thiele A, Winter K, Krause GH (1997) Low inactivation of D1 protein of photosystem II in young canopy leaves of *Anacardium excelsum* under high-light. J Plant Physiol 151: 286-292
- Thimmanaik S, Giridara Kumar S, Jyothsna Kumari G, Suryanarayana N, Sudhakar C (2002) Photosynthesis and the enzymes of photosynthetic carbon reduction cycle in mulberry during water stress and recovery. Photosynthetica 40: 233-236
- Tian X, Darmency H (2006) Rapid bidirectional allele-specific PCR identification for triazine resistance in higher plants. Pest Manag Sci 62: 531-536
- Tourneux C, Peltier G (1995) Effect of water deficit on photosynthetic oxygen exchange measured using <sup>18</sup>O<sub>2</sub> and mass spectrometry in *Solanum tuberosum* L. leaf discs. Planta 195: 570-577
- Trebst A (1991) The molecular basis of resistance of photosystem II herbicides. In: Caseley JC, Cussans GW, Atkin RK eds. Herbicide Resistance in Weeds and Crops. Butterworth-Heinemann, Oxford, pp 145-164
- Tsimilli-Michael M, Strasser RJ (2008) In vivo assessment of stress impact on plant's vitality: applications in detecting and evaluating the beneficial role of mycorrhization on host plants. In: Varma A ed. Mycorrhiza: Genetics and Molecular Biology, Eco-function, Biotechnology, Eco-physiology, and Structure and Systematics. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 679-703
- van Kooten O, Snel JFH (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. Photosynth Res 25: 147-150

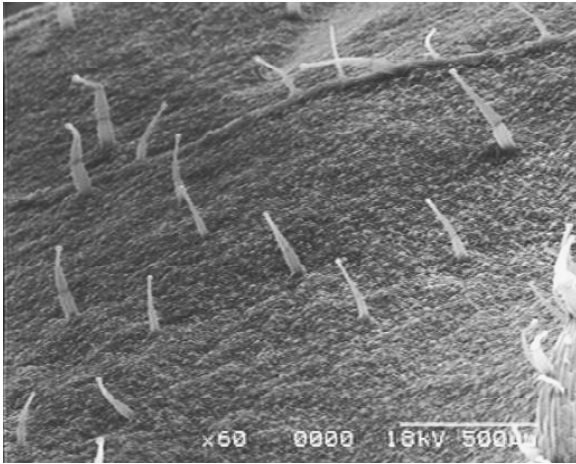
- van Oorschot JLP, Leeuwen PH (1989) Photosynthetic capacity of intact leaves of resistant and susceptible cultivars of *Brassica napus* L. to atrazine. *Weed Res* 29: 29-32
- van Rensen JJS, Rodrigues GC, Vredenberg WJ (2001) Analysis of electron flow around photosystem II in atrazine-resistant plants applying the three-state trapping model on the fluorescence induction curve. In: *Proceedings 12. International Congress on Photosynthesis*, Brisbane, Australia, S14-007
- Váradi Gy, Darkó É, Pölös E, Szigeti Z, Lehoczki E (1994) Xanthophyll cycle patterns and *in vivo* photoinhibition in herbicide-resistant biotypes of *Conyza canadensis*. *J Plant Physiol* 144: 669-674
- Váradi Gy, Polyánka H, Darkó É, Lehoczki E (2003) Atrazine resistance entails a limited xanthophyll cycle activity, a lower PS II efficiency and an altered pattern of excess excitation dissipation. *Physiol Plant* 118: 47-56
- Velthuys BR (1981) Electron dependent competition between plastoquinone and inhibitors for binding to photosystem II. *FEBS Lett* 126: 277-281
- von Caemmerer S, Farquhar GD (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153: 376-387
- von Caemmerer S (2000) *Techniques in Plant Sciences Vol 2: Biochemical Models of Leaf Photosynthesis*. CSIRO Publishing, Collingwood
- Walters RG, Horton P (1991) Resolution of components of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in barley leaves. *Photosynth Res* 27: 121-133
- Walters RG, Horton P (1993) Theoretical assessment of alternative mechanisms for non-photochemical chlorophyll quenching in barley leaves. *Photosynth Res* 36: 741-750
- Walters RG, Ruban AV, Horton P (1994) Higher plant light-harvesting complexes LHCIIa and LHCIIc are bound by dicyclohexylcarbodiimide during inhibition of energy dissipation. *Eur J Biochem* 226: 1063-1069
- Walters RG, Ruban AV, Horton P (1996) Identification of proton-active residues in a higher plant light-harvesting complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14204-14209
- Weiss E, Berry JA (1987) Quantum efficiency of photosystem-II in relation to energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 894: 198-208
- Vermaas WFJ, Arntzen CJ, Gu LQ, Yu C-A (1983) Interactions of herbicides and azidoquinones at a photosystem II binding site in the thylakoid membrane. *Biochim Biophys Acta* 723: 266-275
- Whitmarsh J, Samson G, Poulson M (1994) Photoprotection in photosystem II – the role of cytochrome *b<sub>559</sub>*. In: Baker NR, Bowyer JR eds. *Photoinhibition of Photosynthesis: From Molecular Mechanisms to the Field*. BIOS Sci Publ, Oxford, pp 75-93
- Wraight CA, Crofts AR (1970) Energy-dependent quenching of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts. *Eur J Biochem* 17: 319-327
- Yordanov I, Tsonev T, Goltsev V, Merakchiiska-Nikolova M, Georgieva K (1997) Gas exchange and chlorophyll fluorescence during water and high temperature stresses and recovery. Probable protective effect of carbamide cytokinin 4-PU30. *Photosynthetica* 33: 423-431
- Zhang JX, Nguyen HT, Bluma A (1999) Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *J Exp Bot* 50: 291-302

## 10. FÜGGELÉK

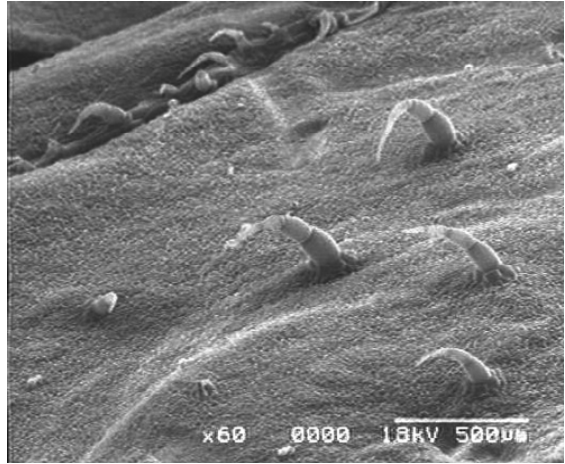


**1. ábra** A vízdeficit hatása a kloroplasztiszok szerkezetére *S. nigrum* AS (a, c, e, g) és AR biotípusaiban (b, d, f, h). Jó vízellátottságú kontroll, a és b; közepes vízhiány (DH2), c és d; erős vízhiány (DH3), e és f; rehidratált a DH3 állapotból, g és h.

(a)



(b)



**2. ábra** Trichómák vizsgálata AS (a) és AR (b) biotípusú *S. nigrum* növények abaxiális levélfelületein Scanning Elektron Mikroszkópiával (60 × nagyítás).

## 11. PUBLIKÁCIÓS LISTA

Tari I, Csiszár J, Gallé Á, **Bajkán Sz**, Szepesi Á, Vashegyi Á (2004) Élettani megközelítések gazdasági növények szárazságtűrésének genetikai transzformációval történő javítására. Bot Közl 90: 139-158

\***Bajkán Sz**, Váradi Gy, Balogh M, Domonkos Á, Kiss GyB, Kovács L, Lehoczki E (2010) Conserved structure of the chloroplast-DNA encoded D1 protein is essential for effective photoprotection via non-photochemical thermal dissipation in higher plants. Mol Genet Genomics 284: 55-63

IF: 2,853

\***Bajkán Sz**, Várkonyi Zs, Lehoczki E (2011) Comparative study on energy partitioning in photosystem II of two *Arabidopsis thaliana* mutants with reduced non-photochemical quenching capacity. Acta Physiol Plant (közlésre elfogadva)

IF: 1,232

Lehotai N, Pető A, **Bajkán Sz**, Erdei L, Tari I, Kolbert Zs (2011) *In vivo* and *in situ* visualization of early physiological events induced by heavy metals in pea root meristem. Acta Physiol Plant, DOI 10.1007/s11738-011-0759-z

IF: 1,232

### Konferencia közlemények:

Tari I, Simon LM, Deér KA, Csiszár J, **Bajkán Sz**, Kis Gy, Szepesi Á (2004) Influence of salicylic acid on salt stress acclimation of tomato plants: oxidative stress responses and osmotic adaptation. (poster) The 14th FESPB Congress, August 23-27, 2004, Cracow, Poland, Acta Physiol Plant, Book of Abstracts, pp. 237

IF: 0,433

Csiszár J, Tari I, Szepesi Á, Gallé Á, Bartha B, **Bajkán Sz**, Zeller D, Vashegyi Á, Pécsváradi A, Horváth F, Lazar A, Camen D, Staicu M, Petolescu (Dragoescu) C, Gabor L, Erdei L (2004) Oxidative stress and total antioxidants as estimated by using ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays in vegetable genotypes. (oral presentation) PHARE Conference, 3-5 September, 2004, Timisoara

Csiszár J, Tari I, Szepesi Á, Gallé Á, Bartha B, **Bajkán Sz**, Zeller D, Vashegyi Á, Pécsváradi A, Horváth F, Lazar A, Dorin C, Staicu M, Petolescu C, Gabor L, Erdei L (2004). Az antioxidáns védőmechanizmus egyes elemeinek vizsgálata zöldségfélékben szárazságstressz hatására. Zárójelentés, 37-43. old., Magyarország – Románia PHARE CBC Program (projekt szám: HU 2002/000, 627, 03-14), Román-magyar miniszimpózium

\***Bajkán Sz**, Váradi Gy, Lehoczki E (2005) The response of photosynthesis to water deficit in atrazine-susceptible and resistant biotypes of *Solanum nigrum*. (oral presentation) The 8th Hungarian Congress on Plant Physiology, The 6th Hungarian Conference on Photosynthesis, August 25-28, 2005, Szeged, Hungary, Acta Biol Szeged 49: 203-205

\***Bajkán Sz**, Váradi Gy, Lehoczki E (2005) Chlorophyll fluorescence quenching analysis of *Solanum nigrum* in relation to water deficit. (poster) The 8th Hungarian Congress on Plant Physiology, The 6th Hungarian Conference on Photosynthesis, August 25-28, 2005, Szeged, Hungary, Acta Biol Szeged 49: 207-209

\*Várkonyi Zs, **Bajkán Sz**, Váradi Gy, Lehoczki E (2005) Light response of the chlorophyll fluorescence parameters and partitioning of absorbed light energy in wild type and *npq4* mutant of *Arabidopsis thaliana*. (poster) The 8th Hungarian Congress on Plant Physiology, The 6th Hungarian Conference on Photosynthesis, August 25-28, 2005, Szeged, Hungary, Acta Biol Szeged 49: 229-232

Szepesi Á, Csiszár J, **Bajkán Sz**, Gémes K, Horváth F, Erdei L, Deér KA, Simon LM, Tari I (2005) (poster) Role of salicylic acid pre-treatment on the acclimation of tomato plants to salt and osmotic stress. The 8th Hungarian Congress on Plant Physiology, The 6th Hungarian Conference on Photosynthesis, August 25-28, 2005, Szeged, Hungary Acta Biol Szeged 49: 123-125

Tari I, Szepesi Á, Csiszár J, **Bajkán Sz**, Gémes K, Horváth F, Erdei L, Deér A, Simon LM (2005) Role of salicylic acid pre-treatment on the acclimation of tomato plants to salt stress. (oral presentation) The 8th Hungarian Congress on Plant Physiology, 6th Hungarian Conference on Photosynthesis, August 22-25, 2005, Szeged, Hungary

**Bajkán Sz**, Tóth T, Holzwarth AR, Garab Gy, Kovács L (2008) Light-induced conformational changes in the reaction center of photosystem II, revealed by fluorescence measurements. (poster) The 9th Congress of Hungarian Society on Plant Biology, June 7-9, 2008, Szeged, Hungary

Tóth T, **Bajkán Sz**, Garab Gy, Kovács L (2008) The role of LHCII in the macro-organization of thylakoid membranes. (poster) The 9th Congress of Hungarian Society on Plant Biology, June 7-9, 2008, Szeged, Hungary

\* A dolgozatban felhasznált közlemények

## 12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Lehoczki Endre Tanár Úrnak mind szakmai, mind emberi támogatását és az együtt töltött három évet.

Köszönettel tartozom az MTA SZBK Növénybiológiai Intézet munkatársainak, Kovács Lászlónak, a dolgozatom elkészítésében nyújtott szakmai segítségéért és a Western blot analízis kivitelezéséért; köszönettel tartozom Tóth Szilviának, a gyors klorofill fluoreszcencia mérésekben nyújtott segítségéért, és a TEM vizsgálatok esetében Mustárdy Lászlónak; megköszönöm Ughy Bettinának és Várkonyi Zsuzsannának a kísérleteim elvégzéséhez nyújtott értékes segítségét és baráti támogatásukat. Köszönet illeti az MBK Genetikai Intézetének munkatársait, Domonkos Ágotát, Balogh Mártát és Kiss György Botondot, a szekvenálási munkáért. Köszönettel tartozom a Corvinus Egyetem Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet tagjainak, Váradi Gyulának, a pigmentösszetétel mérésekben nyújtott segítségéért, műszerek használatának biztosításáért és a dolgozatom revíziójáért, és Szegedi Ernőnek a PCR vizsgálatokban nyújtott segítségéért. Köszönöm az SZTE Növénybiológiai Tanszék munkatársainak, Laskay Gábornak, az angol nyelvű közleményeim lektorálását, külön szeretném megköszönni Kolbert Zsuzsannának baráti és technikai támogatását. Hálás köszönettel tartozom Légrádi Máriának a reciprok keresztezések kivitelezésében nyújtott kiváló asszisztenciáért. Szeretném megköszönni Mihalik Erzsébetnek a SEM vizsgálatokban nyújtott segítségét.

Köszönetet szeretnék mondani Barátaimnak, akik fáradhatatlanul ösztönöztek, támogattak és kitartottak mellettem az évek során. Köszönöm Jávorfí Tamásnak a szeretetét, biztatását, ezen kívül a dolgozatom elkészítésében nyújtott technikai segítséget és az angol nyelvű közlemények lektorálását. Végül, de nem utolsó sorban köszönöm Édesanyámnak hogy éveken keresztül támogatott és segítette munkámat és doktori disszertációm elkészülését.