

PhD értekezés

**Különböző herbicid-rezisztenciák hatása a fotoszintetikus apparátus  
működésére és stresszérzékenységére**

készítette  
Darkó Éva

JATE Növénytani Tanszék

Szeged

1998

## Tartalomjegyzék

	old.
<b>I. Bevezetés</b>	1.
I.1.1 A magasabbrendű növények fotoszintetikus apparátusának felépítése és működése	4.
I.1.2 A fotoszintetikus elektrontranszport folyamatok szabályozása	6.
<b>I.2 Herbicid-rezisztens növények fotoszintetikus tulajdonságai</b>	11.
I.2.1 Atrazin-rezisztencia	11.
I.2.2 Paraquat-rezisztencia	14.
<b>I.3 A fotoszintézis kutatás leggyakoribb in vivo is használatos módszerei</b>	20.
I.3.1 Fluoreszcencia indukció és quenching analízis	20.
I.3.2 CO <sub>2</sub> fixálás	23.
I.3.3 O <sub>2</sub> kiválasztás	23.
I.3.4 Termolumineszcencia	24.
<b>II. Anyagok és módszerek</b>	29.
<b>II.1 Kísérleti növények és nevelésük</b>	29.
<b>II.2 Vizsgálatokhoz használt berendezések, műszerek</b>	30.
II.2.1 Pigment analízis	30.
II.2.2 A klorofill-fluoreszcencia indukció és quenching analízis mérések	32.
II.2.3 Infravörös gázanalízis	34.
II.2.4 Oxigén polarográfia	34.
II.2.5 Termolumineszcencia-mérő berendezés	35.
<b>III. Eredmények és megvitatásuk</b>	36.
<b>III.1 Herbicid-rezisztens növények fotoszintetikus tulajdonságai</b>	36.
III.1.1 A <i>Conyza canadensis</i> szenzitív, atrazin-, paraquat-rezisztens és paraquat/atrazin-rezisztens biotípusainak pigmentösszetétele	36.
III.1.2 A <i>Conyza canadensis</i> szenzitív, atrazin-, paraquat-rezisztens és paraquat/atrazin-rezisztens biotípusainak in vivo fotoszintézisének funkcionális jellemzése	41.
A, Fluoreszcencia indukciós vizsgálatok	41.
B, Termolumineszcencia vizsgálatok	43.
<b>III.2 Herbicid-rezisztens növények fényintenzitás-függő folyamatai</b>	51.
III.2.1 Herbicid-rezisztens növények fényérzékenysége	52.



III.2.2	Herbicide-rezisztens növények fénygátlása	63.
III.2.3	A fénygátlás folyamatainak tanulmányozása	65.
<b>III.3</b>	<b>Paraquat fitotoxikus hatásának tanulmányozása a betyárkóró különböző herbicide-rezisztens biotípusain</b>	<b>71.</b>
<b>III.3. 1</b>	<b>Paraquat hatása a fotoszintetikus elektrontranszport-lánc működésére</b>	<b>72.</b>
A.	Fluoreszcencia indukció és quenching analízis vizsgálata	72.
B	A paraquat fitotoxikus hatásának termolumineszcenciás vizsgálata	76.
<b>III.4</b>	<b>A paraquat-rezisztencia mechanizmusának tanulmányozása</b>	<b>81.</b>
<b>IV.</b>	<b>Összefoglalás</b>	<b>87.</b>
<b>V.</b>	<b>Irodalomjegyzék</b>	<b>95.</b>

## Rövidítések jegyzéke

AL - "actinic light", a fotoszintézist aktiváló fény

AM - aminotriazol, kataláz gátló vegyület

Ant - anteraxantin

AR - atrazin-rezisztens biotípus

CE - cerulenin, de novo zsírsavszintézis-gátló vegyület

CH - cikloheximid, magkódolt fehérjeszintézis-gátló vegyület

CHL - kloramfenikol, plasztisz kódolt fehérjeszintézis-gátló vegyület

DDC - dietil-dithio-carbamate - szuperoxid-dizmutáz gátló vegyület.

DGDG - digalaktoszil-diacilglicerol.

DH - „double hits”, a vízbontó rendszer különböző S állapotai közötti kettős átmenet 1 flash hatására.

DTT - dithiotreitol, violaxantin de-epoxidációját gátló vegyület

Ei - epoxidációs index, a xantofill ciklus aktivitását tükröző paraméter, mely a  $(\text{violaxantin}\% + 0.5 \text{ anteraxantin}\% / 100)$  képlet segítségével számolható.

EQY v.  $\Delta F / F_m' = (F_m' - F_s) / F_m'$  - effektív quantum hatásfok.

F (Fs) - az adott fényintenzitás hatására kiváltott fluoreszcencia egyensúlyi szintje.

Fo - a sötét adaptálás után mért kezdeti fluoreszcencia.

Fo' - a fotoszintézis egyensúlyi helyzetében mért konstans fluoreszcencia.

Fi - a gyors indukciós görbe intermedier fluoreszcencia szintje

Fi-Fo/Fv - a gyors indukciós görbéből számolható, a plasztokinon pool-ig terjedő elektrontranszport hatékonyságára utaló paraméter

Fm - a sötét adaptálás után mért maximális fluoreszcencia.

Fm' - a fotoszintézis aktiválása közben telítési fényintenzitás hatására mérhető maximális fluoreszcencia.

Fv - a sötét adaptálás után meghatározott változó fluoreszcencia ( $F_v = F_m - F_o$ ).

Fv' - a fotoszintézis egyensúlyi szintjekor meglévő változó fluoreszcencia.

$F_v / F_m = (F_m - F_o) / F_m$  - optimális quantum hatásfok.

M - „miss”, a vízbontó rendszer különböző S állapotai közötti átmenet elmaradása a flash hatására.

MGDG - monogalaktoszil-diacilglicerol.

ML - „modulated light” a fluoreszcenciát gerjesztő fény.

NPQ =  $(F_m - F_m') / F_m'$  - sugárzás nélküli energia disszipáció, mely a nem fotokémiai kioltás eltérő módon számolt formája.

PG - foszfatidilglicerol.

PQ - paraquat

PQR - paraquat-rezisztens biotípus

PQAR - paraquat/atrazin-rezisztens biotípus

qE - A nem-fotokémiai kioltás (qN) sötét relaxációjának gyors komponense (qfast), amely az intratilakoidális pH változással összefüggő folyamatokkal áll kapcsolatba. Ezért nevezik e kioltási típust energiafüggő-kioltásnak (qE).

qI - A nem-fotokémiai kioltás sötét relaxációjának lassan, vagy elég hosszú időn keresztül nem relaxálódó komponense (qslow). E paraméter a fotoszintetikus apparátus károsodásával függ össze.

$qN = 1 - (F_m' - F_o') / (F_m - F_o)$  - nem fotokémiai kioltási koefficiens.

$qP = (F_m' - F_s') / (F_m' - F_o')$  - fotokémiai kioltási koefficiens.

qT - A nem-fotokémiai kioltás (qN) sötét relaxációjának középső komponense (qmed.), amely a gerjesztési energia újraelosztásával (state átmenetek) áll kapcsolatban.

Rfd =  $(F_m - F_s) / F_s$  - vitalitási index, a fluoreszcencia kioltási folyamatok és a fluoreszcencia sugárzás aránya. Jól jellemezhető vele a teljes fotoszintetikus elektrotranszport-lánc működése.

S - szenzitív biotípus

SA - Sandoz 9785, linolénsav deszaturáz-gátló vegyület.

SOD - szuperoxid dizmutáz

SP - "saturated pulse", telítési fényimpulzus

STR - szteptomycin

TL - termolumineszcencia

Vio - violaxantin

Zea - zeaxantin



## I. Bevezetés

---

A biológiai (genetikai, mikrobiológiai, növény-, vagy állatélettani) problémák kutatásának egyik gyakran használt módszere a különböző mutánsok előállítása, azok tulajdonságainak tanulmányozása és összehasonlítása a vad típusú törzsekkel. Ennek során az egyes funkciók megváltozásából következtetni lehet a mutáció során megváltozott részek funkcióira, tulajdonságaira. Ugyanezt a módszert gyakran alkalmazzák a fotoszintézis-kutatásban is. Számos alacsonyabbrendű növény mutánsainak létrehozásával újabb és újabb információkat kaphatunk a fotoszintetikus apparátus működéséről. Ugyanakkor a magasabbrendű növények mutánsainak előállítása jóval problematikusabb és költségesebb.

A mezőgazdasági gyakorlatban használt különböző gyomirtószerek tartós alkalmazása herbicid-rezisztens növények kisselektálódásához vezetettek. Ezen növényeknek a fotoszintézis alap kutatásába való bekapcsolódása a mezőgazdasági problémák felmerülése és megoldása mellett, hozzájárultak a fotoszintézis alapfolyamatainak minél teljesebb megértéséhez. Erre jó példa az 1960-as évektől kezdődően a diuron és más PS II fotoszintézisgátló herbicidek használata és az ezek következtében kisselektálódott herbicid-rezisztens növények fotoszintetikus tulajdonságainak vizsgálata. Ezek jelentős mértékben elősegítették a PS II szerkezetének és működésének minél teljesebb megértését (Duysens and Sweers 1963; Hirschberg and McIntosh 1983).

Az 1970-es évek óta, amikor is az első fotoszintézis-gátló herbicidekkel szembeni herbicid-rezisztens növényekről szóló tudományos publikációk megjelentek, több, mint 250 herbicid-rezisztens biotípust írtak le a szakirodalomban (Ryan 1970; Holt and LeBaron 1990; LeBaron & McFarland 1990). Ezek összesen mintegy 15 féle herbiciddel szemben váltak rezisztenssé, melyek közül a legismertebbek és legelterjedtebbek az atrazin-rezisztens (55 faj), valamint a paraquat-rezisztens biotípusok (16 faj) (LeBaron 1991; Preston 1994).

Az atrazin-rezisztens fajok tanulmányozása során kimutatták, hogy a rezisztencia alapja a psbA gén pontmutációja, mely csökkenti az atrazin bekötődésének affinitását. Ugyanakkor az atrazin-rezisztens növények fotoszintetikus tulajdonságainak vizsgálata felhívta a figyelmet arra is, hogy az atrazin-rezisztens növények fotoszintetikus folyamatai jelentős mértékben módosultak a mutáció következtében, beleértve számos, a fotoszintetikus elektrontranszport szabályozásában szerepet játszó folyamatot is.

A másik igen gyakori rezisztencia a paraquat-tal szemben kialakult rezisztencia. Bár a jelenséget széleskörben vizsgálják, az okok felderítése még várat magára. A paraquat



hatásmechanizmusának vizsgálata a paraquat elektrontranszport stimuláló tulajdonságának köszönhetően szintén segíthet a fotoszintetikus elektrontranszport folyamatok tanulmányozásában. Ugyanakkor a paraquat-rezisztens növények fotoszintetikus tulajdonságai még alig ismert.

A 80-as évektől kezdődően a biológiai problémák kutatása (beleértve a növényélettani, fotoszintézis kutatásokat) egyre erőteljesebben fordult a különböző stressz, ill. ökológiai problémák megoldásának irányába. Ilyenek a szélsőséges hőmérsékleti viszonyok, a vízhiány, a fény viszonyok (magas fényintenzitás, UV sugárzás) ill. emberi tevékenység (levegőszennyezés) okozta környezeti problémák. A természetes körülmények között kisselektálódott herbicid-rezisztens növények tanulmányozása során kiderült, hogy számos rezisztens növény stresszérzékenysége is eltér a vad biotípusétól. Ezek okának felderítésével újból csak további ismereteket szerezhethetünk a fotoszintetikus apparátus működéséről. Ugyanakkor számos herbicid-rezisztencia oka és mechanizmusa még ma sem ismert. Ezek felderítésére irányuló kísérletek ismét csak gyarapíthatják a fotoszintetikus folyamatokról kialakult ismereteinket.

Mindezekből is látható, hogy a mesterségesen előállított mutánsok tanulmányozása mellett a különböző herbicid-rezisztens növények fotoszintetikus tulajdonságainak vizsgálata ma is aktuális és hozzásegíthet számos alapkutatási probléma megoldásához is.

Jelen dolgozatban a saját eredmények bemutatása mellett minél átfogóbb képet szeretnék adni fentebb említett két fotoszintézisgátló herbiciddel szembeni rezisztencia kutatások eddig elért eredményeiről. A herbicid-rezisztenciák mechanizmusának vizsgálata mellett e növények módosult fotoszintetikus tulajdonságai lehetőséget biztosítanak a fotoszintetikus apparátus működésének és a különböző stresszhatások folyamatainak tanulmányozására.

A dolgozat tematikája több konkrét probléma megoldását öleli fel. Vizsgálataim során a különböző fotoszintézisre ható herbicidekkel szemben rezisztensé vált növények fotoszintetikus tulajdonságainak tanulmányozásának területeit ezért a következőkben foglalhatnám össze:

1. Atrazin- és paraquat- rezisztenciával rendelkező növények fotoszintetikus tulajdonságainak összehasonlító vizsgálata.
2. Ezen növények stresszérzékenységének vizsgálata, különös tekintettel a magas fényintenzitás okozta károsító hatásokra.
3. Paraquat fotoszintetikus elektrontranszportra gyakorolt hatásának tanulmányozása.

#### 4. Paraquat-rezisztencia mechanizmusának vizsgálata.

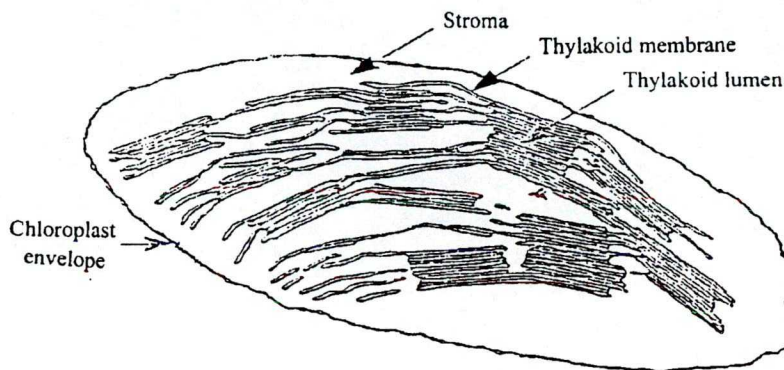
A téma sokszínűségéből következően kissé eltértem a hagyományos PhD dolgozat felosztási rendjétől, nevezetesen fentebb említett témákat külön-külön tárgyalom egyszerre mutatva be az eredményeket és azok diszkusszióját, és ezután térek rá egy másik önálló téma bemutatására. Mindezeket azonban egy hagyományos „keretbe” szorítva teszem, ami tartalmazza a fotoszintézis és herbicid-rezisztencia kutatásának a téma szempontjából legfontosabb ismereteit, a kutatások során felhasznált módszerek elméleti alapjait és gyakorlati felhasználásukat.



## 1.1 A magasabbrendű növények fotoszintetikus apparátusának felépítése és működése

A magasabbrendű (oxigéntermelő) növények fotoszintetikus folyamatainak jelentőségét mutatja, hogy ezek a szervezetek képesek a napfény energiájának felhasználásával a saját szervezetüket szerves anyagokból felépíteni, miközben biztosítják a heterotróf szervezetek oxigén- és tápanyagszükségletét, s eközben felhasználják az azok által kibocsátott széndioxidot.

A magasabbrendű növények fotoszintetikus folyamatai speciális sejtorganellekben, a kloroplasztiszokban mennek végbe (1. ábra).



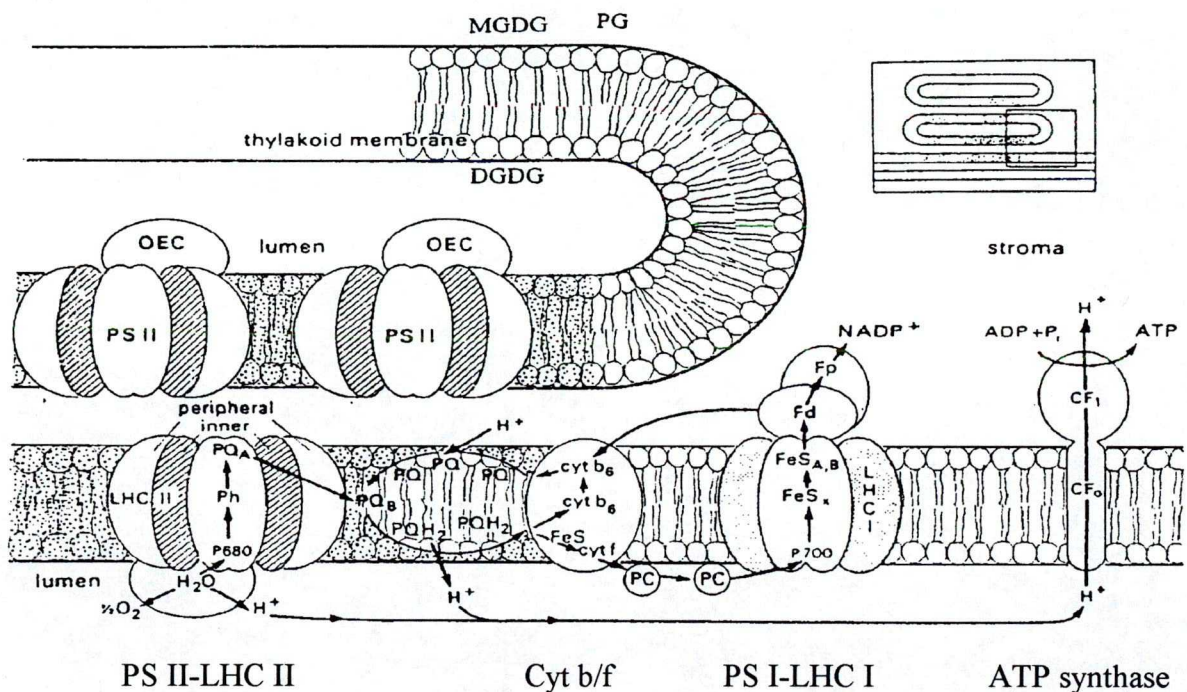
1. ábra: A kloroplasztisz szerkezete.

E sejtalkotókat kettős membrán határolja, melyen belül a teret sztróma tölti ki. A sztrómába ágyazva a kloroplasztisz belső membránrendszere található, melyet tilakoid-membránoknak nevezünk. A tilakoid-membránok szorosan összetapadva gránumokat alkotnak, amiket sztrómatilakoidok kötnek össze. A tilakoid-membránok összefüggő belső üregrendszert határolnak, melyet lumennek nevezünk.

A tilakoid-membránok e strukturális változatosságát funkcionális heterogenitás kíséri. A sztrómában játszódnak le a  $\text{CO}_2$  megkötésének, redukciójának és szénhidrátokká történő alakításának folyamatai, amihez a szükséges energiát (ATP-t) és redukáló erőt ( $\text{NADPH} + \text{H}^+$ -t) a fotoszintézis tágabb értelemben vett fényreakciójaként összefoglalt folyamatok szolgáltatják. Így a sztrómában lejátszódó folyamatok közvetlenül nem igénylik a fény jelenlétét. A fényenergia kémiai energiává történő átalakításának igen bonyolult fotofizikai, fotokémiai és biokémiai folyamatai a tilakoid-membrán lipidrétegébe ágyazódott pigment-protein, protein komplexek ill. egyéb redoxkomponensek igen bonyolult szerveződése és működése révén valósul meg (2. ábra). Ehhez a magasabbrendű növényekben két fotokémiai rendszer (PS I és PS II) alakult ki. A gránumtilakoidokban található PS II reakciócentrumait ( $\text{P}_{680}$ ) felépítő

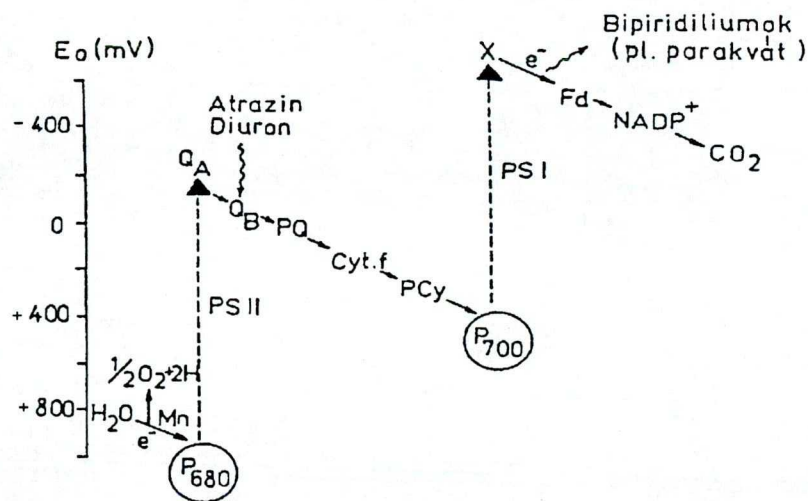


ún. D<sub>1</sub> és D<sub>2</sub> fehérjékből álló heterodimer az ezekhez kapcsolódó járulékos fehérjékkel, a proximális és disztális antenna pigment-protein komplexei, valamint a lumen felőli oldalról a PS II-höz kapcsolódó vízbontó rendszer. A sztrómatilakoidokban lokalizált a PS I reakciócentrum (P<sub>700</sub>), a PS I-hez kapcsolódó fénygyűjtő antenna-komplex, valamint a kémiai energia ATP formájában történő tárolását (a Mitchell-féle kemiozmoszisos elmélet szerint) megvalósító ATP-szintáz. A gránum- és sztrómatilakoidok között helyezkedik el a két fotokémiai rendszert összekötő cytb<sub>6</sub>/f komplex. A tilakoid-membrán lipidfázisában "úszva" találhatóak a fotoszintetikus elektrontranszport-lánc ún. mobilis komponensei közül a plasztokinonok (plasztokinon pool-t képezve), míg a plasztocianin a lumenben, a ferredoxin pedig a sztrómában lokalizált.



**2.ábra:** A fotoszintézis makromolekuláris komplexeinek lokalizáltsága a kloroplasztisz tilakoid-membránjaiban.

A fotoszintetikus folyamatok fényreakcióinak "gerincét" egy redox komponensekből álló lineáris elektrontranszport-lánc képezi, melyben az elektronok a +0,8 V redoxpotenciálú víz/oxigén rendszerből a -0,32 V redoxpotenciálú NADPH/NADP<sup>+</sup> rendszerbe jutnak (3. ábra). Az elektrontranszport-láncban két olyan lépés van, ahol az elektronok mozgása a redoxpotenciálok következtében kialakuló elektrokémiai potenciál gradienssel ellentétes. E lépésekhez a szükséges energiát a két fotokémiai rendszerhez tartozó fénygyűjtő protein-pigment komplexek által elnyelt fény kvantumjai szolgáltatják.



**3.ábra:** A fotoszintetikus elektrontranszport-lánc redox komponensei, néhány fotoszintézis gátló herbicid hatóhelyének feltüntetésével.

Az elnyelt fénykvantumok energiája a két fotokémiai rendszer reakciócentrumaiban ( $P_{700}$ ,  $P_{680}$ ) a gerjesztés hatására bekövetkező töltésszétválasztásakor kémiai energiává alakul. Szűkebb értelemben tehát csupán a primer töltésszétválasztáshoz szükséges fényenergia, a fotoszintetikus elektrontranszport későbbi lépései közvetlenül nem igénylik a fény jelenlétét. A lineáris elektrontranszport további redox komponensei e kémiai energia stabilizálására szolgálnak. A lineáris elektrontranszporton kívül mindkét fotokémiai rendszerben kimutattak egy-egy ciklikus elektrontranszportot is, melyek elsősorban a fotoszintézis fiziológiai szabályozásában vesznek részt. A lineáris (és az első fotokémiai rendszer körüli ciklikus) elektrontranszport működése, valamint a lumen oldalon lejátszódó vízbontás eredményeként a tilakoid-membrán két oldala között elektrokémiai potenciál különbség alakul ki, melynek terhére ATP szintetizálódik.

Mindezek a fotoszintetikus folyamatok azonban igen bonyolult biofizikai, biokémiai folyamatokon keresztül valósulnak meg. Mivel a fotoszintetikus folyamatokra számos tényező hatással van, az optimális működés fenntartása érdekében a növényekben bonyolult szabályozó mechanizmusok alakultak ki.

### I.1.2 Fotoszintetikus elektrontranszport folyamatok szabályozása.

A fotoszintetikus folyamatok természetüknél fogva erősen függenek a külső körülményektől. A fény olyan külső környezeti tényező, ami évszakai, napszakai periodikus változások mellett igen gyors és jelentős intenzitásbeli változásokra is képes. Így a növényeknek a hosszú távú



alkalmazkodás mellett ki kellett alakítaniuk gyors szabályozó mechanizmusokat is, amik megvédik a növényt a hirtelen fényintenzitás okozta károsodásoktól.

A fotoszintetikus apparátus felépítése (pigmentek mennyisége és összetétele) révén képes egy meghatározott mennyiségű fényenergia elnyelésére és kémiai energiává történő átalakítására. Ehhez képest az aktuális fényintenzitás lehet kevesebb, vagy több. Ha a fényintenzitás kevesebb, mint amit a növény átalakítani és hasznosítani képes, a fény gyakorlatilag maximális hasznosítása mellett is, a fotoszintézis alacsony hatékonysággal működik. Ebben az esetben a pigmentösszetétel és a fotoszintetikus apparátus felépítésének módosítása révén hosszútávon lehetőség van az abszorbeált fényenergia növelésére (shade type kloroplasztisz) (Lichtenthaler 1988).

A fényintenzitás növekedésével a fotoszintetikus folyamatok intenzitása nő mindaddig, míg el nem éri a maximális kapacitását. A fényintenzitás növekedésével egyre jelentősebbé válnak azok a folyamatok, amelyek arra irányulnak, hogy az abszorbeált, de már hasznosítani nem képes fényenergiát olyan formává alakítsák át, vagy vezessék el, ami kevésbé károsító a növények számára (down regulation mechanisms). Azonban ha ezeknek a fotoprotektív mechanizmusoknak a kapacitása is kimerül, (akár a fényintenzitás további növekedése miatt, akár egyéb stressztényező hatására) a gerjesztési energia nem tud elvezetődni és olyan toxikus gyökök képződése indul be, amelyek már károsítják a fotoszintetikus apparátust. Ezt a jelenséget nevezzük fénygátlásnak (Powles 1994). Ennek elkerülésére (tartósan magas fényintenzitások mellett (pl. nyáron)) a növény hosszútávon is alkalmazkodni képes a pigmentek mennyiségnek csökkentése és összetételének megváltozása, valamint az egész fotoszintetikus apparátus átszerveződése révén (sun type kloroplasztisz). (Lichtenthaler 1988)

A fotoszintetikus folyamatok első lépései a fényenergia megkötése és továbbítása a reakciócentrumok felé. Az abszorbeált fényenergia mennyisége a fényintenzitástól és a tilakoid-membrán pigment-protein komplexeinek mennyiségétől függ (LHC mérete), ami rövid távon állandónak tekinthető. A fény abszorbeálása, a gerjesztési energia átadása, a primer fotokémiai folyamatok olyan gyorsak ( $10^{-15}$ - $10^{-9}$ s), hogy azok szabályozása nem lehetséges. (Vannak ugyan olyan stratégiák a növényekben, amelyek arra irányulnak, hogy csökkentsék az abszorbeált fényenergia mennyiségét (levél orientáció megváltozása, kloroplasztiszok elmozdulása), de ezek szerepe, jelentősége változó.)

A fotoszintetikus elektrontranszport folyamatok működése során a tilakoid membrán két oldala között elektrokémiai potenciálgradiens alakul ki az irányított elektronvándorlás és az



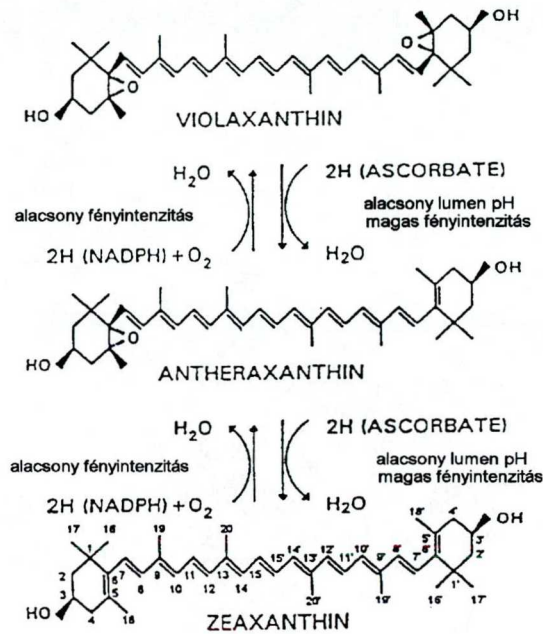
egyenlőtlen protonmegoszlás következtében. Ez az elektrokémiai potenciálkülönbség fényintenzitás növekedésével fokozódik és aktivál számos olyan folyamatot, amely lehetővé teszi a szükséges mennyiségen felül abszorbeált fényenergia ún. nem-fotokémiai úton történő elvezetését, lecsengetését. E folyamatok pontos molekuláris mechanizmusa még nem teljesen ismert (lásd Dau (1994) összefoglaló munkája).

Egyes szerzők feltételezik, hogy a tilakoid membrán lumen oldalának túlzott savasodása következtében a vízbontó rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -ot veszít, aminek következtében aktivitása jelentősen lecsökken. Ez csökkenti a PS II donor-oldali elektronáramlás sebességét, ami  $\text{Tyr}_Z^+$  és  $\text{P}_{680}^+$  élettartamának megnövekedéséhez vezet. Eközben az akceptor oldal is módosul az elektrokémiai potenciálkülönbség hatására, ami megnöveli a  $\text{P}_{680}^+\text{Q}_A^-$  rekombinációjának valószínűségét. Ez egyrészt az elektrontranszport sebességének, másrészt a tilakoid membrán szerkezetének olyan irányú megváltozását eredményezi, ami kedvez a gerjesztési energia termális lecsengésének (Kriegel and Weis 1992,1993). E jelenség *in vitro* jól tanulmányozható, de nem kimutatható *in vivo*. Másrészt nehéz vele értelmezni a  $\Delta\text{pH}$  hatására megfigyelhető LHC II konformációjának megváltozását, valamint egyes nem-klorofill típusú pigmentek (xantofilok) szerepét a folyamatban.

Más szerzők magas fényintenzitáson a LHC II szerkezetének konformációváltozását, aggregálódását figyelték meg, amit az alacsony lumen pH hatására, az LHC II egyes lumen oldali aminosavak (glutamát, aszpartát) protonálódásával magyaráztak (Horton and Ruban 1992). Ez a konformációváltozás megváltoztatja a pigmentmolekulák közötti energiaátadást, elősegíti a felesleges gerjesztési energia hő formájában történő elvezetését (Ruban et al. 1992). Ezt a folyamatot segítik egyes nem klorofill típusú pigmentek (zeaxantin) azáltal, hogy megváltozik a kötődésük az LHC II-höz. (Horton et al. 1991). Viszont LHC II (klorofill b) hiányos mutánsokban sem szűnnek meg teljesen a  $\Delta\text{pH}$ -val összefüggő folyamatok.

Demmig-Adams és Adams az 1980-s évek végén megfigyelték, hogy a fényintenzitás növekedésével a violaxantin átalakul zeaxantinná (4. ábra). Ezt az átalakulást összefüggésbe hozták az intratilakoidális pH megváltozásával (mivel a violaxantin zeaxantin átalakítást végző de-epoxidáz enzim alacsony pH-n aktív), valamint feltételezték, hogy a zeaxantinnek fontos szerepe lehet a gerjesztési energia termális úton történő elvezetésében (Demmig et al. 1987; Demmig-Adams 1990; Demmig-Adams and Adams 1990;1992). Ennek a folyamatnak a molekuláris értelmezését Frank et al. (1994) és Owen (1992;1994) adta meg, kimutatva, hogy energetikailag a klorofill képes átadni gerjesztési energiáját a zeaxantinnek, ami már képes hő formájában kis adagokban szétszórni azt. Ebben az esetben az alacsony pH-nak az a szerepe,

hogy egyrészt indukálja a zeaxantin átalakulást, másrészt lehetővé teszi a klorofillok és a zeaxantin közelkerülését, olyan orientációban való elhelyezkedését, hogy minél kedvezőbb legyen a gerjesztési energia átadásának és hő formájában történő elvezetésének.



**4.ábra:** A xantofill ciklus

Lichtenthaler és munkatársai a zeaxantin szerepének értelmezésénél a violaxantin és a zeaxantin kémiai szerkezetéből indultak ki. Szerintük a xantofill ciklus pigmentek általa védik a fotoszintetikus apparátust a fotooxidatív károsodásoktól, hogy eliminálják azokat a káros oxigén molekulákat, amelyek károsíthatnák a reakciócentrumokat (Lichtenthaler and Schindler 1992) és a tilakoid-membrán lipideket (Havaux et al. 1993). Havaux legújabb vizsgálata során a zeaxantinnak egy teljesen új oldalú megközelítése is felvetődött. Korrelációt mutattak ki a membránfluiditás csökkenés és a zeaxantin-tartalom között. Szerintük a zeaxantinnak fontos szerepe van a PS II komplex stabilizálásában (Havaux and Gruszecki 1993; Havaux and Tardy 1996). Mindezek az elméletek azonban nehezen magyarázzák a  $\Delta\text{pH}$  kialakulása és a zeaxantin átalakulása közti időbeli különbségeket.

Mindezek ismeretében az derül ki, hogy a  $\Delta\text{pH}$ -val összefüggő és a magas fényintenzitáson igen jelentős energia-függő folyamatok tényleges molekuláris mechanizmusa igen összetett és még ma sem teljesen ismert (Dau 1994).

A fényviszonyok változása során előfordulhat, hogy nemcsak a fény intenzitása, hanem a spektrális összetétele is megváltozik, ami azt eredményezheti, hogy a két fotokémiai rendszer gerjesztése között az egyensúly felborul és az egyik, vagy másik gerjesztése túlsúlyba kerül.



Ebben az esetben egy más típusú szabályozás révén lehetőség van a gerjesztési energia újraelosztására. Ezt a folyamatot nevezzük state1-state2 átmenetnek. Ez a folyamat a PQ pool oxidáltsági vagy redukáltsági állapotától függően a Cytb/f komplex által aktivált kináz és foszfatáz enzimek szabályozása alatt áll (Allen 1992). A PS II túlgerjesztése esetén a redukált Q<sub>B</sub>-k aránya megnő, aminek hatására a cytb/f komplex segítségével aktiválódik egy kináz enzim. Ez foszforilálja az LHC II-t. A foszforilált LHC az elektrosztatikus taszítóerők megnövekedése miatt a tilakoid membrán síkjában elmozdulhat, leválik a PS II core-ről, ezáltal csökkenti a PS II által abszorbeált fényenergiát. Megjegyzem azonban, hogy a state1-state2 átmenet is igen bonyolult folyamatok sorozatán keresztül valósul meg, amelyek pontos mechanizmusa még ma sem teljesen ismert (Allen 1992).

Mivel a fotoszintetikus elektrontranszport folyamatok végtermékei által (ATP, NADPH) szorosan kapcsolódnak a CO<sub>2</sub> fixálás folyamataihoz, az optimális működés biztosítása érdekében fontos ezek optimális arányának fenntartása. Ehhez járul hozzá a lineáris elektrontranszport mellett a PS I körüli ciklikus elektrontranszport (Bendall and Manasse 1995). De szabályozó szerepet tulajdonítanak a PS II körüli ciklikus elektrontranszportnak is (Barber and de Las Rivas 1993). Mivel kísérleteim során ezeket a folyamatokat nem vizsgáltam ezeket részletesen nem kívánom ismertetni.

Míndezek a folyamatok arra hivatottak, hogy beállítsák és szabályozzák a fotoszintetikus elektrontranszport folyamatok optimális működését bármely fényviszonyok mellett, segítség a felesleges gerjesztési energia elvezetését, megakadályozva ezzel a fotoszintetikus apparátus károsodását. Amennyiben a fényintenzitás tovább emelkedik, és/vagy a fentebb leírt fotoprotektív folyamatok már nem képesek megvédeni a fotoszintetikus apparátust, akkor a fotoszintetikus apparátus károsodása miatt a fotoszintézis hatékonysága csökkenni fog. A magas fényintenzításra igen érzékeny második fotokémiai rendszer inaktiválódása figyelhető meg leghamarabb. Ekkor az akceptor és/vagy a donor oldal károsodásának következtében a D1 protein megsérül, így a továbbiakban nem tud részt venni a fotoszintetikus apparátus működésében (Powles et al. 1984; Barber and Andersson 1992; Prasil et al. 1992). A sérült PS II reakciócentrumok javítására lehetőség van, mivel a D1 protein igen gyorsan újraszintetizálódik és a sérült reakciócentrumok újraszerveződnek a már kijavított, vagy kicserélt D1-el (Aro et al. 1993). A repair folyamatok szintén részét képezhetik a szabályozásnak, hiszen az inaktív reakciócentrumok képesek lehetnek megvédeni a még aktív reakciócentrumokat az abszorbeált fényenergia hővé való átalakítása révén (Krause et al. 1990; Schnettger et al. 1994).



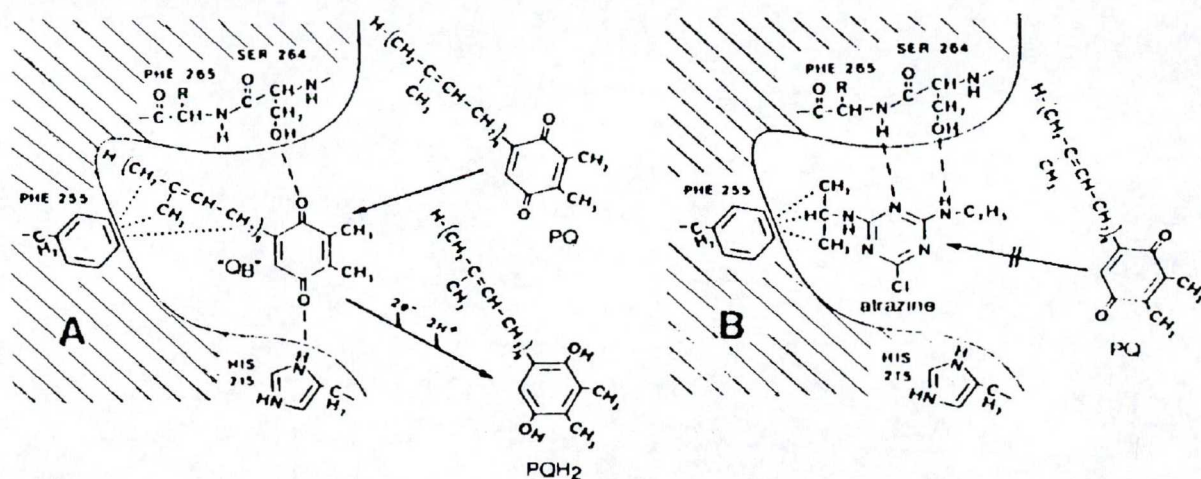
Mind a szabályozás, mind a fotoszintetikus apparátus optimális működése szempontjából rendkívül fontos a pigment-protein ill. protein komplexek harmadlagos szerkezete, orientációja, elhelyezkedése a tilakoid membránban, a tilakoid-membrán összetétele, fizikai állapota (fluiditása, permeabilitása). Ezért ezen tényezők bármelyikének megváltozása módosíthatja az egész fotoszintetikus apparátus felépítését és működését.

## I.2. Herbicid-rezisztens növények fotoszintetikus tulajdonságai

### I.2.1. Atrazin-rezisztencia

Az atrazin régóta ismert és használt gyomirtószer, amely fotoszintézis-gátló hatását úgy fejt ki, hogy gátolja a PS II akceptor oldalán a  $Q_A$  és  $Q_B$  elektronakceptorok közötti elektrontranszportot (3. ábra). Ennek oka, hogy a  $D_1$  protein 4. és 5. transzmembrán hélice által alkotott  $Q_B$  kötőhelyre bekötődve kompetitíven gátolja a  $Q_B$  bekötődését (5. ábra).

Mind az atrazin, mind a  $Q_B$  bekötődésében kulcsfontosságú a Ser<sub>264</sub> aminosav. Az atrazin-rezisztens növényekben a kloroplasztisz genom psbA génjének ebben a pontban bekövetkezett pontmutációja a Ser<sub>264</sub>-es aminosav Gly-re történő cserélődését eredményezte (Hirschberg and McIntosh, 1983; Goloubinoff et al. 1984). Ez csökkenti az atrazin bekötődésének affinitását a  $Q_B$  kötőhelyre, így atrazin-rezisztenciát eredményez (Pfister és Arntzen, 1979). A Ser<sub>264</sub> → Gly<sub>264</sub> aminosavcsere azonban a  $Q_B$  bekötődésének affinitását is csökkenti, mivel a  $Q_B$  kötődésében jelentős szerepet játszó  $D_1$  protein Ser<sub>264</sub> hidroxil csoportja és a  $Q_B$  karbonil oxigénje közötti hidrogénhid-kötés a mutáció következtében megszűnik. Ez csökkenti a  $Q_A$  és  $Q_B$  közötti elektronátadás sebességét (Bowes et al. 1980).



5. ábra: A plasztokinon (A) és az atrazin (B) bekötődése a  $D_1$  protein  $Q_B$  kötő helyére.



Azonban az atrazin-rezisztens növények fotoszintetikus tulajdonságai számos más ponton is eltérnek a szenzitív növényekétől. Megfigyelték, hogy az atrazin-rezisztens biotípusok plasztisztaiban sokkal kevesebb keményítőszemcse található, mint a szenzitívékéiben. Egyes atrazin-rezisztens gyomnövények kloroplasztisz-szerveződésére az ún. "árnyék-típusú" kloroplasztiszok jellemzőek, ami megnyilvánul a gránum-tilakoidok nagyobb arányában, a pigmentösszetétel módosulásában, stb. (Burke et al. 1982; Lemonie et al. 1986). Ezek a tulajdonságok azonban nem minden esetben figyelhetők meg és erősen függnak a nevelési körülményektől.

Különbséget találtak a tilakoid membrán lipidösszetételében is. Az atrazin-rezisztens biotípusok több MGDG-t, kevesebb DGDG-t és PG-t tartalmaznak, mint a szenzitívek. A rezisztens növények membránlipidjei gazdagabbak telítetlen zsírsavakban, elsősorban linolénsavban. Ezek a változások a tilakoid-membrán lipid-kettősrétegének fluiditásnövedését eredményezhetik (Burke et al. 1982; Lehoczki et al. 1985).

A D<sub>1</sub> protein pontmutáció egyik következményének tekintik a Q<sub>A</sub> és Q<sub>B</sub> elektronakceptorok közötti elektrontranszport lassulását is (Bowes et al. 1980), ami a mutáció következtében bekövetkező Q<sub>B</sub> bekötődés affinitáscsökkenésével vagy a Q<sub>B</sub>/Q<sub>B</sub><sup>-</sup> középponti redoxpotenciál eltolódásával magyarázható. (Demeter et al. 1985). Azt is megállapították, hogy a pontmutációnak és a Q<sub>A</sub>→Q<sub>B</sub> elektronátmenet lelassulásának nem feltétlenül következménye a fotoszintetikus hatékonyság csökkenése, mert ez a lépés nem limitálja a teljes elektrontranszport-lánc sebességét (Ort et al. 1983; van Oorschot and van Leeuwen, 1984). Ennek ellenére számos atrazin-rezisztens növényben megfigyelhető a teljes fotoszintetikus elektrontranszport-lánc hatékonyságának csökkenése, ami megmutatkozik az O<sub>2</sub> kiválasztás ill. a CO<sub>2</sub> fixálás kapacitásának csökkenésében (Bowes et al. 1980; Holt et al. 1981; 1983; Jansen et al. 1986; Ireland et al. 1988). Ez arra utal, hogy az atrazin-rezisztens növények atrazin hiányában elvesztik előnyüket és kisebb produktivitásuk révén háttérbe szorulnak a szenzitív populációkkal szemben (Gressel 1985; Holt et al. 1990).

A Q<sub>A</sub>→Q<sub>B</sub> elektronátmenet lelassulása megnöveli a redukált Q<sub>A</sub> arányát, ami a fluoreszcencia kisugárzás intenzitásának megnövekedéséhez vezet. Ez megmutatkozik a fluoreszcencia intenzitásának magasabb steady-state szintjében (saját adat). A sötétadaptált növényi mintán felvett gyors fluoreszcencia görbe vizsgálata során egyértelműen kimutatható, hogy az indukciós görbe I szintje (F<sub>i</sub>) jelentős mértékben megemelkedett az atrazin-rezisztens növényekben. Ez az eltérés megnyilvánul az F<sub>i</sub>-F<sub>o</sub>/F<sub>v</sub> paraméter magasabb értékeiben. (Mivel az F<sub>o</sub> és F<sub>m</sub> paraméter nem különbözik szignifikánsan a két biotípus esetében (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> közel



azonos), a megnövekedés az  $F_i$  paraméter megváltozásának köszönhető.) Az  $F_i$ - $F_o$ / $F_v$  paraméter kapcsolatba hozható azokkal az inaktív reakciócentrumokkal, amelyekhez nem kötődik  $Q_B$  molekula (un PS II non-reducing RC), így feltételezhető, hogy az atrazin-rezisztens növényekben a PS II heterogenitása is eltér a szenzitív növényekétől.

A fluoreszcencia lecsengés tanulmányozása során egyértelműen kimutattott, hogy a fluoreszcencia lecsengés kinetikája is eltérést mutat a két biotípusnál. Ez megnyilvánul mind a  $Q_A \rightarrow Q_B$  elektronátadás (gyors komponens), mind az  $S_2Q_A$  rekombinációjából származó (back reakció) eltérő mértékében.

Kimutatták továbbá, hogy az atrazin-rezisztens növények hőmérséklet érzékenysége is eltér a szenzitív biotípusétól. A hőmérséklet emelkedésének hatására az atrazin-rezisztens növények  $O_2$  kiválasztása alacsonyabb hőmérsékleten kezd csökkenni, mint a szenzitív biotípusé (Ducruet and Ort 1988). A mutáció következtében a  $Q_A$  redukáltsági foka megnő és ez a hőmérséklet emelkedésének hatására kifejezettebben nő, mint a szenzitív növények esetében, jelezve az atrazin-rezisztens növények kisebb hőtoleranciáját (Ducruet and Lemoine, 1985; Havaux, 1989; Dulai et al. 1998). Ez megnyilvánul abban is, hogy magasabb ( $25-30^{\circ}C$ ) hőmérsékleten a rezisztens biotípusok szervesanyag produkciója és így a versenyképessége kisebb a szenzitív biotípushoz képest (Conard and Radosevich, 1979; Warwick, 1980; Ahrens and Stoller, 1983). Ezzel szemben alacsony hőmérsékleten az atrazin-rezisztens növények szervesanyag produkciója nagyobb (Ricroch et al. 1987). Téli körülmények között a rezisztens biotípusok nagyobb életképességet mutatnak, mint a szenzitív biotípusok (Schonfeld et al. 1987; Dulai et al, 1998). Ezek a megfigyelések összhangban állnak az atrazin-rezisztens növényeknél megfigyelt eltérő lipidösszetétellel és a fluidabb tilakoid membránnal.

A fotoszintézis szabályozása című fejezetben leírtak alapján egyértelmű, hogy a növények igen érzékenyen reagálnak a fényintenzitás okozta változásokra. Az atrazin-rezisztens növények fényintenzitás-függő viselkedése is jelentős mértékben eltér a szenzitív növényekhez képest. Kimutatták, hogy az atrazin-rezisztens növények fotoszintézise általában érzékenyebb a magas fényintenzitásokra, mint a szenzitívéké (Holt et al. 1981; Hart and Stemler, 1990; Sundby et al. 1993a). Kimutatták, hogy az atrazin-rezisztens növények D1 protein turnover-e magas fényintenzitású kezelések alatt és után is gyorsabb, mint a szenzitív növényeké (Sundby et al. 1993b). Ez értelmezhető úgy, hogy a magas fényintenzitású kezelések hatására a nagyobb fényérzékenység miatt a degradált reakciócentrumok aránya nagyobb az atrazin-rezisztens növényekben, így az ezeket javító repair folyamatok intenzitása is megnő. Ez következménye



lehet az atrazin-rezisztens növények nagyobb fényérzékenységének, de nem magyarázza meg, hogy miért nő meg ezen növények fényérzékenysége.

Így összefoglalva elmondható, hogy az atrazin-rezisztens növényekben kimutatható mutáció következménye, nemcsak a fotoszintetikus elektrontranszport lelassulása a  $Q_A$ - $Q_B$  közötti szakaszon, hanem ezek mellett számos olyan pleiotropikus tulajdonságot is eredményez, amely csak közvetve vagy egyáltalán nem magyarázható a pontmutációval. Így az atrazin-rezisztens növények fotoszintetikus tulajdonságai még számos ponton nem kellőképpen értelmezettek, és ezek vizsgálata további felvilágosítást adhat a fotoszintetikus apparátus működésének minél teljesebb megértéséhez.

### **I.2.2 Paraquat-rezisztencia**

A paraquat egy olyan nem szelektív kontakt hatású fotoszintézisre ható herbicid, ami (az atrazinnal ellentétben nem a PS II akceptor oldalán gátolja az elektrontranszportot, hanem) a PS I akceptor oldalán a fotoszintetikus elektrontranszport-lánchoz kapcsolódva onnan az elektronokat a természetes elektrontranszport útról eltéríti és azokat a molekuláris oxigénnek adja át (Bowyer and Camilleri 1987; Kunert and Dodge 1989; Fujii et al. 1990). A bekötődés pontos helye eddig még nem ismert, de a különböző PS I akceptorok (vas-kén centrumok: -550-590mV; ferredoxin: -420 mV) és a paraquat (-446 mV) középponti redoxpotenciálja alapján feltételezhető, hogy a paraquat valahol a két említett akceptor között kötődve fejt ki elektroneltérítő hatását (Bowyer and Camilleri 1987; Kunert and Dodge 1989). A paraquat elektroneltérítő hatásának köszönhetően egyrészt megakadályozza, hogy a ferredoxin át tudja adni az elektronját az oxidált NADP-nek, megakadályozva ezzel elegendő mennyiségű NADPH képződését, meggátolja a  $CO_2$  fixációt, felborítja a kloroplasztisz energiaháztartását. Másrészt hatására olyan toxikus oxigén (szuperoxid-, hidroxil- és oxigényökök) majd lipidperoxid származékok jönnek létre, amelyek károsítják az igen érzékeny tilakoid membránt (Babbs et al. 1989; Kunert et al. 1989; Bihari et al. 1983). Mivel a paraquat fitotoxikus hatása mindaddig fennáll, amíg fény van jelen (működik a fotoszintézis), ezért fényintenzitástól és koncentrációtól függően a toxikus gyökök képződése olyan nagymennyiségű lehet, hogy a növényi sejt természetes antioxidáns védekező rendszere (Salin 1991) nem képes közömbösíteni a képződő toxikus gyököket, így a tilakoid membránstruktúra integritása



megbomlik, a sejtmembrán kilyukad, a citoplazmatartalom kiáramlik és a növény teljes föld feletti része fokozatosan elszárad.

A paraquat fitotoxikus hatása a fotoszintetikus elektrontranszportra gyakorolt hatásából következően erős fényintenzitás-függést mutat (Lehoczki et al. 1992.).

A paraquat hatóanyagú Gramaxon huzamosabb idejű használata itt is herbicid-rezisztens növények kisselektálódásához vezetett. A PS I akceptor oldalán bekövetkező mutáció kézenfekvő magyarázat lehetne a paraquat-rezisztencia okára, hasonlóképpen az atrazin-rezisztenciához, azonban eddig ezt az elképzelést a vizsgálatok nem igazolták (Powles et al 1987; Fuerst et al. 1985; Harvey et al. 1978). Továbbá megfigyelték, hogy a paraquat ugyanolyan hatást fejtett ki a rezisztens növényekből izolált tilakoidon, mint a szenzitív növényekből izoláltakon, ami szintén azt mutatja, hogy a rezisztencia okát nem a kloroplasztiszon belül kell keresni.

Mi lehet tehát a rezisztencia oka? Erre a kérdésre a mai napig nem tudunk pontos feleletet adni. Nincs még egységes magyarázat a paraquat-rezisztencia elméletére, csak különböző hipotézisek. Ennek egyik oka lehet, hogy a mind a vizsgált objektumok, mind a vizsgálati módszerek rendkívül szerteágazóak és nem lehet egységes következtetést (általánosítást) levonni belőlük. Az is lehetséges, hogy az eddig talált paraquat-rezisztens fajok nem mindegyike "használja" ugyanazt a stratégiát, amit alátámaszthat az a megfigyelés is, hogy a különböző paraquat-rezisztens növények eltérő öröklődést mutatnak. Az eddig vizsgált egyedeknél találtak egygénes domináns és receszív, valamint poligénes öröklődésű fajokat is (Fuerst and Vaughn 1990).

A következőkben röviden bemutatom az eddig felvetődött hipotéziseket, hozzáfűzve néhány saját gondolatot.

A PS I oldali mutáció vagy módosulás lehetőségét már említettem, ami, mint kiderült nem valószínű. A másik lehetőség, hogy a paraquat metabolizálódik a sejten belül, de ezt eddig csak néhány baktérium és gomba esetében figyelték csak meg (Carr et al. 1985; Imai et al. 1989) viszont nem volt kimutatható magasabbrendű növényeken (Harvey et al. 1978; Normann et al 1993). A legújabb vizsgálatok szerint azonban felmerült annak a lehetősége, hogy a paraquat metabolizálódik, kémiaiilag átalakul, vagy kötődik valamilyen anyaghoz a magasabbrendű növényekben is, mivel kimutatták, hogy a paraquat rezisztens *Rehmannia glutinosa* vizes extraktuma csökkenti a paraquat-szenzitív növények paraquattal szembeni érzékenységét. Sajnos azonban az extraktumban a paraquat fitotoxikus hatásának csökkentéséért felelős anyagot ezidáig nem sikerült azonosítani (Chun et al. 1997).



Érdekes megfigyelés továbbá, hogy a paraquat annak ellenére, hogy kétértékű kation igen gyorsan képes keresztüljutni a kutikulán, elérni hatóhelyét a kloroplasztiszban és ebben a két biotípus között nincs szignifikáns különbség (Bishop et al 1987). Ennek ellenére az egyik lehetséges elképzelés a paraquat-rezisztencia mechanizmusára, hogy a paraquat valamilyen oknál fogva később, vagy csökkent mennyiségben éri el a kloroplasztiszt a paraquat-rezisztens növényekben, vagy egyáltalán el sem éri azt. Levélnyélen keresztül felvetett  $^{14}\text{C}$ -el jelzett paraquat segítségével megfigyelték, hogy a paraquat mozgása korlátozott a rezisztens növényben (Bishop et al. 1987, Preston et al, 1994). Ezekben a kísérletekben azonban a paraquat mozgása ellentétes volt a „fiziológiásan” várható mozgással, hiszen a permetezéssel kiszórt paraquat a levél kutikuláján keresztül jut be a növénybe és, ha szállítódik, akkor ez inkább floém transzporton keresztül valósul meg, noha kétértékű ion lévén joggal elvárható, hogy a paraquat könnyen mozogjon a xilém-ben is. Megjegyzem továbbá, hogy ha a permetezéssel kiszórt paraquat a levélfelületre jut és onnan be a levél szöveteibe, akkor nem feltétlenül szükséges a xilém, vagy a floém keresztül szállítódnia ahhoz, hogy elérje hatóhelyét a levél mezofilumában. Ennek ellenére a legújabb vizsgálatok kimutatták, hogy a bazipetális transzport is korlátozott ezekben a növényekben, akkor is, amikor intakt levélen keresztül, üzemi dózisban és olyan körülmények között alkalmazták a paraquat-t, ami megfelelt a mezőgazdaságban használtakkal (Preston et al. 1992). Megemlítem azonban, hogy ezekben a kísérletekben a paraquat végül ugyanúgy elpusztította a leveleket a rezisztens növények esetében is, mint a szenzitíveknél, de a rezisztens növények képesek voltak újra kihajtani, míg a szenzitív növények nem (Powles személyes közlése). Autóradiográfiás kísérletek is igazolták a paraquat csökkent mozgását a rezisztens növényekben. Kimutatták, hogy meghatározott idő múlva a paraquat egyenletes eloszlást mutatott a szenzitív növényben, míg ugyanannyi idő alatt a rezisztens növényben a radioaktivitás csak a levél alsó részén volt megfigyelhető (Fuerst et al. 1985; Tanaka et al. 1986; Bishop 1987).

A paraquat fitotoxikus hatásai közé tartozik, hogy a képződő toxikus oxigéngyökök hatására a klorofill bomlik (photobleaching) és ekkor nagymennyiségű feofitin mutatható ki. Szenzitív és rezisztens levélkorongok paraquat oldatos kezelésének hatására megfigyelték, hogy a szenzitív növény levélkorongjai a teljes levélfelületen, míg a rezisztens növény levélkorongjai csak a szélén károsodtak, jelezve, hogy a rezisztens növényben a paraquat gyorsabban immobilizálódik, mint ahogy a levélkorongok szélén keresztül bejut a növénybe. Fluoreszcens imaging technika segítségével a paraquat felvétel és transzport vizsgálata során kimutatták, hogy a



diquat lassabban jut el a hatóhelyére a rezisztens növényekben, mint a szenzitívekben (Preston et al. 1994).

Hogyan lehetséges, hogy a rezisztens növényekben a paraquat mozgása korlátozott?

Az egyik lehetséges mechanizmus a paraquat kizáródására vonatkozóan az, hogy mivel a paraquat kétértékű kation könnyen képes abszorbeálódni a negatív töltésű felületeken, amit a talajkolloidok esetében ki is mutattak (Akhavain and Linscott 1966). (Ez az oka annak, hogy a paraquat-t a növény a talajon keresztül nem képes felvenni.) Ugyanez a jelenség azonban lejátszódhat a különböző sejtkomponensek felületén is, így e hipotézis szerint a paraquat kizáródás oka valamilyen sejtkomponensre történő kötődés lehetne. A sejtfal lehetne e kötődés egyik célpontja, mivel ismert, hogy a sejtfal képes számos iont megkötni (Baydoun and Brett 1988; Piscoci et al. 1987), így akár a paraquat-t is (Powles et al. 1987). Ezt támasztják alá *H. glaucum* izolált protolaszton végzett kísérletei (Powes et al. 1987), de cáfolják a *C. bonariensis* és *A. calendula* paraquat ill. diquat és sejt fall kötődési vizsgálatai (Fuerst et al. 1985; Preston et al. 1994).

A másik elképzelés, hogy a paraquat passzív, vagy aktív felvétellel (egy transzporter segítségével) jut be a sejtbe, és a rezisztens növényekben ez az aktív transzport mechanizmus módosult, aminek következtében a paraquat-t nem, vagy csak nehezebben veszi fel a sejt. Ezt a megfigyelést támasztja alá az is, hogy a paraquat felvétel gátolható volt kadaverinnel (poliamin), bár ugyanakkor nem volt gátolható putreszcinnel (Preston et al. 1992). Másik lehetőség, hogy a sejten belül passzív, vagy aktív transzporttal egy membránnal körülzárt sejtorganellumba szállítódik (pl. vakuolum). Irodalmi adatok igazolják, hogy a vakuolum fiziológiás körülmények között számos iont képes tárolni (Ca, Mg, Na, poliaminok, ammónium sók) (Schumaker and Sze 1986; Pfeffer et al. 1987; Boller and Wiemken 1986; Leigh and Jones 1986; Piscocci et al. 1988), ezért feltételezik, hogy a paraquat olyan szállítómolekula közvetítésével jut a membránnal körülzárt sejtorganellumba, ami normális körülmények között más kationokat szállít.

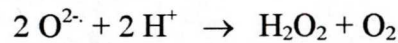
De bármelyik hipotézis valósul is meg egy-egy rezisztens növényben, ezen elképzelések szerint a paraquat-rezisztencia oka, a paraquat csökkent mértékű eljutása, vagy teljes kizáródása a kloroplasztiszból, így fitotoxikus hatását nem tudja kifejteni.

A következő elképzelés a paraquat fitotoxikus hatásmechanizmusával függ össze. Ugyanis a paraquat kezelés hatására képződő nagymennyiségű toxikus oxigénszármazékok az antioxidáns enzimrendszer fokozott működése eredményeképpen nem tudják kifejteni károsító hatásukat.

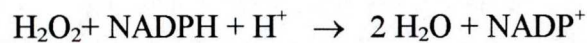


Ilyen enzimek a szuperoxid-dizmutáz (SOD), az aszkorbinsav peroxidáz, a glutation reduktáz, valamint a kataláz, ami a citoplazmában lokalizálva található meg.

A SOD megtalálható mind a kloroplasztiszban, mind a citoplazmában, valamint a mitokondriumokban is és feladata a képződött szuperoxidok elbontása a kevésbé károsító hidrogénperoxidra:



Ezt aztán az aszkorbinsav peroxidáz vízzé alakítja át, majd a glutation reduktáz segítségével ismét visszaalakul aktív formává.



Azonban e séma alapján a növény továbbra sem tud mit kezdeni a paraquat kezelés hatására képződő hidroxil gyökökkel.

Ezt az elméletet számos vizsgálati eredmény támasztja alá, ugyanakkor számos cáfolja is. Conyza bonariensis vizsgálata során kimutatták, hogy mind sejt, mind plasztisz szinten SOD aktivitás növekedés volt megfigyelhető a paraquat-rezisztens növényekben. Emellett aszkorbinsav peroxidáz és glutation-reduktáz aktivitásnövekedés is detektálható volt (Shaaltiel and Gressel 1986,1987). Ugyanakkor ezekből a vizsgálatokból kimutatható, hogy a 1,5-2x enzimaktivitás növekedés nem áll összhangban a vizsgált növények igen magas (100-200-as) rezisztencia faktorának értékeivel.

Más fajokon, így pl. *L. perenne*-n, *C. reinhardtii*-n is kimutattak enzimaktivitás növekedést, ez azonban sok esetben csak egy-egy enzimre vonatkozott és nem az összes antioxidáns enzimre (Harper and Harvey, 1978; Bray et al. 1993). Ugyanakkor nem volt kimutatható enzimaktivitás növekedés *H. glaucum* és az *E. canadensis* esetében (Powles and Cornic 1987, Pölös et al. 1988).

Felvetődik továbbá, hogy amennyiben a paraquat-rezisztens növényekben az antioxidáns enzimrendszer aktivitása magasabb, akkor ennek védenie kell a növényt egyéb olyan stressztényezőkkel szemben is, amelyek szintén toxikus oxigényökök képződését idézik elő (fénystressz, ózonstressz, SO<sub>2</sub>, szárazság). Egyes vizsgálatok igazolták (Jansen et al. 1989), mások cáfolták (Preston et al. 1991) ezt.

További problémát jelent, hogy e hipotézis nem magyarázza, mi történik a paraquattal, hiszen ha az állandóan jelen van a kloroplasztiszban, akkor hiába az antioxidáns enzimrendszer fokozott működése, a növény energiaháztartása előbb-utóbb kimerül, továbbá megszűnik a CO<sub>2</sub> megkötésből származó szervesanyag utánpótlás. Mindezek előidézhetik a növény pusztulását. Ezért ez a védekező mechanizmus átmenetileg védelmet nyújthat a paraquat



károsító hatásának kivédésére, de emellett feltétlenül szükség van egy másik mechanizmusra is, amely eltávolítja a paraquat-t a hatóhelyről.

A Magyarországon azonosított paraquat-rezisztens betyárkóró vizsgálata egy újfajta megközelítést nyújt a paraquat-rezisztencia vizsgálatában. Lehoczki és munkatársai intakt növények paraquat-tal történő permetezése során kimutatták, hogy a paraquat mind a szenzitív, mind a rezisztens növényben igen gyorsan megjelenik a hatóhelyen, kifejtí károsító hatását. Ez a gátló hatás azonban végleges és a növény teljes pusztulásához vezet a szenzitív növény esetében, míg csak átmeneti, néhány óráig tartó a rezisztens növények esetében. Ezt a jelenséget nevezték tranziens vagy átmeneti gátlásnak, amit több oldalról is bizonyítottak (Lehoczki et al. 1992).

Fluoreszcencia indukciós kinetikai vizsgálatok szerint a paraquat kezelést követően a sötétadaptált levél megvilágítást követő maximális fluoreszcencia intenzitása ( $F_m$ ) igen rövid időn belül jelentősen lecsökken mind a szenzitív, mind a rezisztens növényekben. A fluoreszcencia kisugárzás intenzitása a növény károsodásának mértékének arányában pár órán belül szinte teljesen megszűnik a szenzitív növényben, míg rezisztens növények esetében az  $F_m$  pár óráig fokozatosan csökken, majd lassan újra emelkedésnek indul, és 24 órán belül visszaáll az eredeti értékre. Megjegyzem, hogy a paraquat kezelés hatására bekövetkező maximális fluoreszcencia intenzitás csökkenése eredhet az aktív PS II reakciócentrumok számának csökkenéséből, valamint a paraquat elektronelszívó hatásából. Ha a paraquat a hatóhelyén található, akkor az mintegy elszívja az elektronokat az PS I-től, ami serkentően hat a PS I és PS II közötti elektrontranszportra. Ez oxidálja a PQ pool-t, így a  $Q_B$  nagyobb valószínűséggel tudja fogadni az elektronokat a  $Q_A$ -ról, ami megnöveli az oxidált  $Q_A$  arányát. Ez viszont fluoreszcencia intenzitáscsökkenéshez vezet.

Paraquat kezelés hatására a rezisztens növény fényindukált  $CO_2$  felvétele átmenetileg, a szenzitív növény  $CO_2$  felvétele irreverzibilisen gátlódik, amit  $^{14}CO_2$  segítségével mutattak ki (Lehoczki et al. 1992). Hasonló jelenség figyelhető meg paraquat kezelt levélkorongok  $O_2$  fejlődésének vizsgálata során is (Lehoczki et al. 1992).

Irodalmi adatok szerint az intakt levelek etán termelése arányos a lipid-peroxidáció mértékével (Dumelin and Tapel 1977). A kezeletlen szenzitív és rezisztens növények etán produkciója között nincs szignifikáns különbség. Paraquat kezelés hatására azonban a szenzitív növényben kezdetben nyolcszoros etán termelődés fokozódás figyelhető meg, majd a növény fokozatos pusztulásával az etán termelődés is megszűnik. A rezisztens biotípusoknál azonban csak





háromszoros fokozódás tapasztalható, s ez is rövid időn belül visszaáll az alapállapotra (Lehoczki et al. 1992).

A tranziens gátlás jelensége részben cáfolja, részben megerősíti (kiegészíti) a korábbi elméleteket. Egyrészt egyértelműen mutatja, hogy a paraquat igen rövid időn belül képes bejutni a kloroplasztisza mindkét biotípus esetében elegendő mennyiségben ahhoz, hogy toxikus hatását ki tudja fejteni. Így a paraquat csökkent transzportja, vagy elsődleges kizáródása nem valószínű ezen növény esetében. Viszont a tranziens gátlás „regenerálódási” szakaszában a paraquat fotoszintézis-gátló hatása fokozatosan megszűnik, vagyis eltávolodik a hatóhelyéről. Ennek hátterében állhat a paraquat metabolizálódása (lebomlása, konjugáció képzés), másodlagos kizáródása, eltávolodása a hatóhelyéről akár a vakuolumba, akár más membránnal körülhatárolt sejtorganelumba. Viszont az sem kizárható, hogy az antioxidáns enzimrendszernek fontos szerepe van a paraquat fitotoxikus hatásának eliminálásában a tranziens gátlás szakaszában.

Azonban a paraquat rezisztencia mechanizmusa még egyetlen növény esetében sem tisztázott, így a paraquat-rezisztencia problémája nyitott. Ugyanakkor a paraquat-rezisztens növények fotoszintetikus tulajdonságai sem ismertek kellőképpen. E kérdések tisztázásával esetleg választ kaphatunk egyéb általános fotoszintetikus folyamatokra is.

### **I.3. A fotoszintézis kutatás leggyakoribb in vivo is használatos módszerei**

#### **I.3.1 Fluoreszcencia indukció és quenching analízis**

A fotoszintetikus folyamatok során a fotoszintetikus pigmentek az elnyelt fényenergia hatására gerjesztett állapotba kerülnek. E gerjesztési energia sorsa különböző lehet. Egyrészt a nem reakciócentrum pigment molekulák eljuttatják gerjesztési energiájukat a reakciócentrum pigment-molekulákra, és a töltésszétválasztás révén az elektronok különböző instabil (P<sub>heo</sub>), majd stabil (Q<sub>A</sub>) akceptor molekulákra kerülnek, lehetőséget biztosítva a gerjesztési energia fotoszintetikus folyamatokban való hasznosulásához. Másrészt az abszorbeált fényenergia el sem jut a reakciócentrum molekulákra, energiája fluoreszcencia fény vagy hő formájában szétszóródik, vagy ha el is jut azok fotokémiai folyamatokban nem hasznosulnak (pl. back reakció), így okozva ezzel fluoreszcencia kisugárzást.

Így tehát az abszorbeált fényenergia (A) sorsa lehet: fotokémiai hasznosulás (k<sub>P</sub>), termális dezaktiváció (hőkibocsátás) (k<sub>H</sub>), vagy fluoreszcencia kisugárzás(k<sub>F</sub>).



$$A = k_P + k_F + k_H$$

Ez utóbbi kettő a fotoszintézis számára elvesző energia, de mégsem haszontalan. A két folyamat közül a fluoreszcencia kisugárzás rendkívül gyors ( $10^{-9}$ s) folyamat, így annak fiziológiai szabályozására nincs lehetőség, míg a hő formájában történő energia kisugárzás egy igen bonyolult védekező mechanizmus része, amely megvédi a fotoszintetikus apparátust az abszorbeált fényenergia okozta károsodásoktól (lásd I.1:2 fejezet).

Az összefüggésből is látható, hogy a fluoreszcencia kisugárzás, a termális dezaktiváció és a fotokémiai hasznosulás egymással komplementer folyamatok, így a fluoreszcencia fény intenzitásának, és kinetikájának detektálásán keresztül, lehetőségünk nyílik annak meghatározására, hogy a gerjesztési energia milyen mértékben hasznosul a fotoszintetikus folyamatokban, s mekkora hányada vész el a termális dezaktiváció (hőkibocsátás) révén (Krause and Weis 1991.).

Ha egy előzetesen sötétadaptált növényi mintát (levelet, kloroplasztisz preparátumot, stb.) megvilágítunk, a klorofill-a fluoreszcenciájának intenzitása időben változik és jól definiálható lokális maximumok és minimumok sorozatán keresztül éri el a rá jellemző egyensúlyi (steady-state) értéket. Ez a jelenség a fluoreszcencia indukció, vagy más néven Kautsky-effektus (Kautsky and Hirsch 1931). Amíg azonban ez az állapot beáll a fotoszintézis számos részfolyamatának kell egymással egyensúlyba kerülni. A fluoreszcencia indukció alapját az ezen jelenségek háttérben álló (biofizikai, biokémiai és élettani) folyamatok képezik.

A sötétadaptált növényi mintát megvilágítva a fény bekapcsolását követően a fluoreszcencia intenzitása néhány ps alatt egy kiindulási szintre ( $F_0$ ) ugrik fel, amelynek intenzitását nagyban befolyásolja a növény pigmentösszetétele és fiziológiai állapota, valamint a gerjesztő fény intenzitása. Ezután egy átmeneti (intermedier) ( $F_i$ ) szint következik, majd kb. egy s alatt eléri maximális fluoreszcencia ( $F_p$  vagy  $F_m$ ) értékét (gyors szakasz). Amennyiben a fényintenzitás elegendő volt az összes  $Q_A$  redukálásához, a fluoreszcencia intenzitása maximális lesz ( $F_m$ ). Ezután a fluoreszcencia intenzitása további megvilágítás esetén is csökken, és néhány perc után (5-15 min) eléri a körülményektől (fényintenzitás és spektrális összetétel) és a növény fiziológiai állapotától függő steady-state értéket ( $F_s$ ) (lassú szakasz). A fluoreszcencia indukció gyors és lassú szakaszának háttérben eltérő jelenségek állnak.

Sötétadaptált növényi mintában a  $Q_A$  oxidált állapotban van, így fluoreszcencia intenzitása minimális ( $F_0$ ). Egy ilyen mintát megvilágítva az elsődleges kinon akceptorok redukált állapotba kerülnek (zárt reakciócentrum), további elektronok fogadására nem képesek. Ilyenkor a fotokémiai energiahasznosítás valószínűsége lecsökken (0) és megnő a



komplementer folyamatok, így a fluoreszcencia kisugárzás valószínűsége ( $F_m$ ). Folyamatos, a fotoszintézist aktiváló fényel történő megvilágítás esetén a  $Q_A$  molekulák reoxidálódnak, a  $Q_B$  és az elektrontranszport-lánc későbbi komponenseinek működése által, (nyitott reakciócentrum) és egy részük újra képes az elektronok fogadására, így a gerjesztési energia fotokémiai folyamatokban történő hasznosulásának lehetősége ( $k_p$ ) megnő, ami a fluoreszcencia intenzitásának ( $k_f$ ) csökkenésével jár együtt. A  $Q_A$  tehát fluoreszcencia kioltóként működik és így az ezzel összefüggő folyamatokat fotokémiai kioltásnak ( $qP$ ) nevezzük. Emellett folyamatos megvilágítás esetén (lassú szakasz) működésbe lépnek más alternatív energia-kisugárzási módok, amelyek szintén csökkentik a fluoreszcencia kisugárzás intenzitását (hőkibocsátás). Ez utóbbi folyamatok háttérben igen bonyolult molekuláris mechanizmusok állnak, amelyeket összefoglaló néven nem-fotokémiai kioltásoknak nevezünk ( $qN$ ).

A nem-fotokémiai kioltások típusainak megismerése és mechanizmusának intenzív kutatása a modulációs elven működő fluoriméterek megjelenésével indulhatott meg (Orgen and Baker 1985; Schreiber et al. 1986). Ezek közül a legjelentősebbek a pH vagy energia-függő ( $qE$ ), az ATP-függő ( $qT$ ) és a fénygátlással kapcsolatos ( $qI$ ) kioltások (Krause and Weis 1991; Schreiber and Bilger 1993). E folyamatok háttérben azon a molekuláris mechanizmusok állnak, amelyek egyben részét képezik a fotoszintetikus folyamatok szabályozási mechanizmusainak is (lásd I.1.2). A három kioltási típus megnyilvánul a nem-fotokémiai kioltás paraméterében, azonban időbeli megjelenésük és jelentőségük nagyban eltér. A három nem-fotokémiai kioltási típus közül az energia-függő kioltás arányait tekintve a legjelentősebb és időben leghamarabb megjelenő (Krause and Weis 1991). A fénygátlással összefüggő kioltási típus jelentős lehet olyan körülmények között, amikor a PS II reakciócentrum károsodása igen nagyfokú.

Optimális működés esetén (ideális fény és hőmérsékleti viszonyok mellett) a fotokémiai folyamatok aránya meghaladja mindkét kompetitív folyamat mértékét. Amennyiben az abszorbeált fényenergia fotokémiai hasznosulása valamilyen környezeti tényező hatására (fényintenzitás változás, hőmérséklet változás, stb.) módosul, megváltozik az alternatív folyamatok valószínűsége is. Így a fluoreszcencia intenzitásának és a kioltási mechanizmusok arányának megváltozásából következtethetünk a teljes fotoszintetikus apparátus működésére.

Habár a fluoreszcencia indukció és quenching analízis módszere a fotoszintetikus folyamatok tanulmányozásának egy indirekt vizsgálati módszere, számos előnnyel rendelkezik és így széles körben elterjedt a fotoszintézis kutatásban.



### I.3.2 CO<sub>2</sub> fixálás

A fotoszintetikus folyamatok aktivitásának, hatékonyságának direkt mérését teszik lehetővé a CO<sub>2</sub> megkötés mértékének meghatározása. A CO<sub>2</sub> fixálás során, a sztrómában lokalizált enzimatikus folyamatok sorozatán keresztül a CO<sub>2</sub> egyszerű cukrokká, majd később számos más vegyületté alakul át, miközben felhasználják a fotoszintetikus elektrontraszport-lánc működése során képződő végtermékeket (ATP, NADPH). A Calvin ciklus működése a végtermékeken kívül számos szabályozási ponton is kapcsolódik a fotoszintetikus elektrontraszport-lánc működéséhez. Mivel azonban én sem a CO<sub>2</sub> fixálás, sem annak szabályozásának folyamatait nem tanulmányoztam, ezért ezekkel most részletesen nem foglalkozok. Vizsgálataink során csupán a fotoszintetikus folyamatok aktivitását direkt módon, a CO<sub>2</sub> megkötés fényintenzitás függésének mérésén keresztül jellemeztük. Ezzel kapcsolatban ismert, hogy a fényintenzitás növekedésével a CO<sub>2</sub> megkötés mértéke növekszik, majd telítési fényintenzitáson és normális fiziológiai körülmények a fotoszintetikus apparátus működésének limitálójává, meghatározójává válik.

### I.3.3 O<sub>2</sub> kiválasztás

A fotoszintetikus aktivitás egyik közvetlen mérésére ad lehetőséget az oxigénkiválasztó rendszer működése. Ennek során a PS II donor oldalán található vízbontó rendszer szolgáltatja a PS II ill. végsősoron az egész fotoszintetikus elektrontranszport-lánc számára az elektronokat. A víz bontása többlépéses folyamat eredményeképpen jön létre, melynek során két molekula vízből  $4\text{H}^+$ ,  $4\text{e}^-$  és egy molekuláris oxigén képződik. A protonok hozzájárulnak a fotoszintetikus folyamatok működése során az intratilkoidális  $\Delta\text{pH}$  kialakulásához, míg az elektronok közbeiktatott redox komponensek (TyrZ) segítségével pótolják a PS II primer töltésszétválasztása miatt oxidálódott  $\text{P680}^+$  hiányzó elektronját. Kok és Joliot flash sorozat indukálta oxigénfejlődés tanulmányozása során a vízbontó rendszer 4-es periódusú oszcillációját figyeleték meg, a 3. és az azt követő minden 4. flash-re adva maximális intenzitású jelet (Joliot et al. 1969; Kok et al. 1970). E jelenség magyarázatára született a Kok modell, miszerint flash-k hatására a vízbontó rendszer egy-egy elektron leadásával egyre oxidáltabb állapotba kerül (töltésfelhalmódás), amik a víz bontása során felszabaduló elektronok által pótlódnak. A flash indukált 4-es periódus értelmezésére feltételezték, hogy a vízbontó rendszer 5 redox állapot között oszcillál (So, S1, S2, S3, S4). Ezek közül az So, S1



állapotok sötétben stabilak, és 25-75%-os megoszlást mutatnak, míg az S2, S3 állapotok 30-100s-os élettartamuak. Folyamatos megvilágítás ill, nagy számú flash-k hatására azonban az S állapotok kiegyenlítődnek (25%) a „miss”-nek (nincs redox állapot növekedés) és a „double hits”-nek (redox állapot növekedése kettővel) köszönhetően (Joliot and Kok 1975). Ezeknek a folyamatoknak nagy szerepe van a flash-k hatására történő oszcilláció csillapodásában. A különböző S állapotokat a vízbontó rendszer Mn atomjainak oxidációs állapotának megváltozása idézi elő. (Debus 1992). Ezeken kívül a vízbontás folyamatában, annak stabilitásának biztosításában ill. működésének szabályozásában a  $Ca^{2+}$  és  $Cl^-$  ionoknak is meghatározó szerepe van (Debus 1992). Mindezek a folyamatok jól tanulmányozhatók oxigénpolarográfiával, de fontos szerepük van a thermolumineszcencia jel detektálásában és értelmezésében is.

### I. 3.4 Termolumineszcencia

A lumineszcencia (késleltetett fluoreszcencia) kisugárzás akkor jön létre, ha a megvilágított növényi mintában megvilágítás hatására a PS II primer töltésszétválasztása révén képződött töltéspárok (+-) rekombinálnak és energiájukat lumineszcencia fény formájában kisugározzák. Állandó hőmérsékleten ez a jelenség késleltetett fluoreszcencia kisugárzás formájában jelentkezik, ami decay kinetikai vizsgálatokkal jól tanulmányozható és erős T-függést mutat. Ha a rekombinációt alacsony hőmérsékletű kezeléssel megakadályozzuk (csapdázzuk a töltéspárokat), majd sötétben a hőmérséklet emelésével biztosítjuk a rekombinációhoz szükséges energiát, a hőmérséklet emelkedésével meghatározott hőmérsékleteken késleltetett fluoreszcencia kisugárzást tapasztalunk, amit termolumineszcencia kisugárzásnak, és az Arnold and Sherwood (1957) által felfedezett jelenséget pedig termolumineszcenciának nevezünk. Kimutatták, hogy a szobahőmérsékleten végzett decay kinetikai vizsgálatok lassú komponense és a termolumineszcencia jel háttérében azonos biofizikai folyamatok állnak (Rutherford et al. 1984).

Megemlítem továbbá, hogy amint a fluoreszcencia jelensége is elsősorban a PS II-höz kötött folyamat, ugyanúgy a termolumineszcencia jel is főként PS II eredetű.

A termolumineszcencia jel detektálásához a mérés megkezdése előtt töltéspárokat kell létrehozni, amit a fotoszintetikus apparátus különbözőféle gerjesztésével (flash, folyamatos megvilágítás) érhetünk el. A gerjesztés hatására a reakciócentrumokban primer töltésszétválasztás jön létre, és a töltéspárok (+-) több lépésen keresztül az akceptor ill. donor



oldalon stabilizálódnak. Az akceptor oldali stabilizációt képezik azok a folyamatok, amikor a RC-ból az elektron néhány ps alatt a feofitinre jut, majd innen az elsődleges stabil elektronakceptorra, a  $Q_A$ -ra (300 ps), majd tovább a másodlagos kinon elektrtonakceptorra, a  $Q_B$ -re (100-200 us). A  $Q_B^-$  már hosszú ideig képes stabil maradni (több 10s-h) A donor oldalon a  $P_{680}^+$  igen gyorsan redukálódik a TyrZ-nek nevezett redoxkomponens által, majd ezt redukálják a vízbontó komplex Mn-komplexei. A vízbontó rendszer működéséről ismert, hogy 4 redox állapotot mutat ( $S_0$ - $S_4$ ), amik közül az  $S_0$ ,  $S_1$  állapotok stabilak ugyan, de nem vesznek részt a TL jel kialakításában (Inoue 1996). Erre csak az  $S_2$ ,  $S_3$  állapotok alkalmasak, mert egyrészt elég hosszú ideig stabilak ahhoz, hogy a TL jel detektálható legyen, másrészt + töltést hordoznak. Az  $S_4$  állapot életideje túl gyors a TL jel kialakításához (Inoue 1996). Újabb vizsgálatok szerint a  $TyrD^+$  is részt vehet a TL jel kialakításában, de nem kizárható a  $TyrZ^+$  jelenléte sem (Inoue 1996).

A töltésstabilizációs lépések során az abszorbeált fényenergia egy része elvész, a töltéspárok csapdázódnak, ami megakadályozza, hogy a back-reakció könnyen végbemenjen. Az alacsony hőmérsékleten csapdázódott töltéspárok felmelegítés hatására pótolják az egyes redox lépésekben elvesztett energiájukat és végül  $P680^+Feo^-$  töltéspárt képeznek, majd ezek rekombinációjából származó  $P680^*$  a gerjesztési energiáját kisugározza (TL jel). Könnyen belátható, hogy minél több lépésen keresztül zajlott le a töltésstabilizáció, minél nagyobb redoxpotenciál különbség alakult ki a töltéspár két komponense között, annál nagyobb energia (magasabb hőmérséklet) szükséges azok rekombinálódásához, így annál nagyobb hőmérsékleten jelentkezik a TL sáv. A termolumineszcencia viszonylag régóta használt vizsgálati módszer a fotoszintézis kutatásban, így számos, a megvilágítás hatására képződött és alacsony hőmérsékleten csapdázódott töltéspárok hőmérséklet emelkedés hatására létrejövő rekombinációjából származó TL görbe már jól jellemzett (Vass and Inoue 1992; Vass and Govindjee 1996).

Ezek közül részletesen csak azon sávok ismertetésére térek ki, amelyekkel magam is foglalkoztam.

### **B sáv:**

Az egyik legjobban jellemzett sáv a +30-35 °C körül jelentkező B sáv, ami *in vivo* és normál fiziológias állapotban az  $S_2Q_B^-$  és  $S_3Q_B^-$  töltéspárok rekombinációjából származhat (Rutherford et al. 1982; 1985). Normál körülmények között a két sáv nem szétválasztható, de izolált



tilakoidokon és alacsony hőmérsékleten (77K) történt megvilágítás esetén a két sáv két különálló sáv-re válik szét, (B1:S<sub>3</sub>Q<sub>B</sub> (+20°C) és B2:S<sub>2</sub>Q<sub>B</sub> (+30°C)).

Sötétadaptált állapotban a vízbontó rendszer S állapotai zömmel S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub> állapotban vannak (25:75), míg az akceptor oldalon a Q<sub>B</sub><sup>-</sup>:Q<sub>B</sub> arány izolált tilakoidokon hosszú sötétadaptálás mellett 25:75, míg in vivo vagy rövid sötétadaptálás mellett a 50:50%-os megoszlást mutat. Ennek hatására a B sáv flash indukálta sorozatra 4-es periódusú oszcillációt mutat, in vitro sötétadaptáltsági állapottól függően 1. és 5. ill. 2. és 6. flash-re adva a maximális intenzitású jelet (Inoue and Shibata 1977; Demeter and Vass 1984; Demeter et al. 1984; Rutherford et al. 1984). Ennek oka, hogy a TL jel detektálásánál a vízbontó rendszer 4-s periódusú oszcillációjára ráépül az akceptor oldali Q<sub>B</sub><sup>-</sup>/Q<sub>B</sub> 2-s oszcillációja. In vivo azonban a 2. és 6. flash-re adott a maximális intenzitású jel a jellemző. A flash indukált oszcilláció a flash-k számának növekedésével csökken (hasonlóképpen a vízbontó rendszer működéséhez) a mintegy 10%-os Miss-knek (M) és az 5%-os Double Hit-knek (DH) köszönhetően. A TL jel intenzitásának értelmezésénél azt is figyelembe kell venni, hogy az S<sub>3</sub><sup>+</sup>Q<sub>B</sub><sup>-</sup> töltéspárok rekombinációjából származó TL jel intenzitása mintegy 1.7x nagyobb, mint az S<sub>2</sub><sup>+</sup>Q<sub>B</sub><sup>-</sup> töltéspár rekombinációjából származó jel intenzitása (Rutherford et al. 1985; Demeter et al. 1985). Mindezek figyelembevételével elmondható, hogy elméletileg sötétadaptálás után 1 flash-re "tisztá" S<sub>2</sub><sup>+</sup>Q<sub>B</sub><sup>-</sup> -t, 2 flash-re kevert S<sub>2</sub><sup>+</sup>/ S<sub>3</sub><sup>+</sup>Q<sub>B</sub><sup>-</sup>, 3 flash-re "tisztá" S<sub>3</sub><sup>+</sup>Q<sub>B</sub><sup>-</sup> -t kapunk. (Megj. leszámítva a M és DH-k okozta eltolódásokat.) (Inoue 1996).

Kimutatták továbbá, hogy a B sáv érzékenyen reagál a környezeti változásokra (hőmérséklet, pH, fényintenzitás), ami megmutatkozik a B sáv intenzitásának és hőmérsékleti maximumának (T<sub>m</sub>) megváltozásában (Inoue 1981; Miranda and Ducruet 1995a; Misra et al. 1997).

In vivo vizsgálatoknál a B sáv pozíciója ill. viselkedése jelentősen eltérhet az izolált tilakoidokra jellemző értéktől, ami egyrészt magyarázható a különböző fiziológias körülményekkel, másrészt az in vivo biológiai minta nagyfokú variabilitásával (Farineau 1993).

#### **Q sáv:**

DCMU ill. más PS II akceptor oldali elektrontranszport-gátló herbicidekkel a Q<sub>A</sub> és Q<sub>B</sub> közötti elektrontranszport gátlható, aminek eredményeképpen a termolumineszcencia görbe felvétele során egy intenzív sáv figyelhető meg 0°C körül (Rubin and Venediktov 1969). Ez a Q sáv, és az S<sub>2</sub>Q<sub>A</sub> töltéspárok rekombinációjából származik (Demeter and Vass 1984). Érdekes megfigyelés, hogy a különböző Q<sub>A</sub> és Q<sub>B</sub> között gátló herbicidek eltérő hőmérsékleti maximumú termolumineszcencia jelet adnak: a fenol típusú herbicidek esetében a Q sáv



maximuma  $-10^{\circ}\text{C}$ , az urea és triazin típusú herbicidek esetében  $+5^{\circ}\text{C}$  körül jelentkezik (Vass and Demeter 1982). Ez egyben arra is utal, hogy a különböző herbicid családba tartozó herbicidek, noha ugyanolyan típusú gátlást fejtenek ki, különböző a hatóhelyük, vagy a hatásmechanizmusuk kissé eltérhet.

Megjegyzem továbbá, hogy a Q sáv, *in vitro*, izolált tilakoidokon végzett kísérletekben inhibitorok nélkül nem kimutatható, viszont *in vivo* speciális fiziológiai körülmények hatására detektálható. Pl. magas fényintenzitású előkezelések hatására a B sáv (aminek intenzitása az ilyen kezelésekkor jelentősen csökkenhet és hőmérsékleti maximuma eltolódhat) mellett egy  $+5^{\circ}\text{C}$ -on megjelenő sáv is megfigyelhető, melynek intenzitása a sötétadaptációval csökken, de még 20 perces sötétadaptálás után sem tűnik el teljesen (Farineau 1993). A szerző ezt az észrevételt azzal magyarázza, hogy *in vitro* valószínűleg a PQ pool reoxidációja jóval gyorsabb, mint *in vivo*, és a  $+5^{\circ}\text{C}$ -on megfigyelhető sáv olyan  $\text{S}_2\text{Q}_A$  rekombinációból származik, amikor a teljes PQ pool redukált állapotban van (Farineau 1993).

#### **AG sáv:**

Régóta ismert, hogy a far red (FR) megvilágítás késleltetett fluoreszcencia növekedést indukál (Bertsch and Azzi 1965). Ez megfigyelhető volt intakt leveleken, izolált kloroplasztiszokon, de nem volt megfigyelhető izolált tilakoidokon vagy ettől kisebb partikulumokon (Björn 1971; Sundblad 1988; Hideg et al. 1991). Ez azt sugallja, hogy a távoli vörös fénykezelés hatására létrejövő késleltetett fluoreszcencia kisugárzás megnövekedéséhez intakt rendszer, ill. a tilakoid membrán épsége szükséges. Kimutatták továbbá, hogy PS II inhibitorok ill. szétkapcsolók gátolták ezeket a folyamatokat, ami a PS II akceptor oldali működésének és az intratilakoidális pH gradiens részesedésére utal ezekben a folyamatokban (Björn 1971; Schmidt and Senger 1987; Nakamoto et al. 1988). Továbbá PS I ciklikus elektrontranszport gátlókkal ill. serkentőkkel a folyamat lassítható ill. gyorsítható (Björn 1971). Ismert, hogy far red megvilágítás hatására elsősorban a PS I gerjesztődik, oxidálva ezáltal a PS II és PS I közötti elektrontranszport szakasz redox komponenseit. Emellett a távoli vörös fény a PS II donor oldalán a vízbontó rendszer S állapotainak random eloszlását, ill. az akceptor oldali negatív töltés hiánya miatt az  $\text{S}_2\text{S}_3$  állapotok életidejének megnövekedését eredményezik (Sundblad et al. 1988). Mindezek ismeretében feltételezhető, hogy ez az erős hőmérséklet függést mutató lumineszcencia kisugárzás növekedés a transzmembrán pH gradiens közreműködésével egy visszafelé történő elektronáramlás és a nagyobb stabilitású  $\text{S}_2\text{S}_3$  közötti töltéspárok rekombinációjából származik (Krause et al. 1987; Rienitz et al. 1974; Schreiber 1984). Far red



megvilágítás hatására a hőmérséklet emelkedésével 40-50 °C között egy határozott sáv jelenik meg (AG). E sáv 10s-s far red megvilágítás után eléri maximális intenzitását, ami azt mutatja, hogy a töltésrekombináció mellett időre van szükség az AG sáv kialakulásához (Miranda and Ducruet 1995b). Továbbá mind az alacsony, mind a magas hőmérséklet drasztikusan csökkenti e sáv intenzitását, ami megerősíti, hogy a tilakoid membrán épsége elengedhetetlen e sáv kialakulásához. Fagypontra alatti hőmérsékleten a tilakoid membrán károsodik, ami csökkenti az intratilkoidális pH-t a tilakoid membrán két oldala között és jelentős mértékben hozzájárul az AG sáv intenzitásának csökkenéséhez is (Miranda and Ducruet 1995b). Ugyanakkor a megemelkedett hőmérséklet megnöveli a PS II<sub>β</sub> centrumok számát, és csökkenti a far red kezelés hatására történő lumineszcencia kisugárzást, valamint az AG sáv intenzitását (Hideg et al. 1991; Miranda and Ducruet 1995b). Az állandó hőmérsékleten megfigyelt távoli vörös fénykezelésre adott lumineszcencia kisugárzást, valamint az AG sáv hasonló tulajdonságai megerősíti, hogy a két jelenség háttérében azonos folyamatok állnak, amelyek közül a legfontosabb, hogy a tilakoid membrán integritása meghatározó szerepű.

#### **HTL sáv:**

Az igen magas hőmérsékleten (60-80°C) megjelenő TL sáv (HTL) már nem áll közvetlen összefüggésben a PS II redox komponenseinek töltésrekombinálásával. Kísérleti eredmények igazolják, hogy e sáv inkább kapcsolatba hozható a lipid-peroxidáció során képződött termékeknek a klorofillal történő reakciójával. Azaz e sáv megjelenése ill. intenzitásának növekedése jelzi a károsodott fotoszintetikus apparátus jelenlétét, a lipidperoxidok képződésének mértékét (Vavilin et al. 1991; Hideg and Vass 1993). Az oxidatív károsodásra utal az is, hogy anaerob körülmények között e sáv eltűnik, jelezvén, hogy a TL jel kialakulásához oxigén szükséges (Hideg and Vass 1993). Stallaert és mtsai szoros korrelációt mutattak ki a lipidperoxidáció mértéke és a HTL sáv intenzitása között (Stallaert et al. 1995).



## II. Anyagok és módszerek

---

Ebben a fejezetben csak általánosságban szeretném ismertetni azokat a növényeket és vizsgálati módszereket, amelyeket a vizsgálataim során használtam, és az egyes kísérleteknél pontosítom azok megvalósítási módját.

### II.1. Kísérleti növények és nevelésük

Bár kísérleteim során számos szenzitív és atrazin-rezisztens növényt felhasználtam, kísérleti eredményeim elsősorban a betyárkóró (*Conyza canadensis* (L.) Cronq.) faj esetében mutatom be és esetleg megjegyzésként hivatkozok más fajokra (*Chenopodium album*, *Solanum nigrum*, *Epilobium* sp.). E fajválasztás azért is célszerű, mert kutatócsoportunk rendelkezik az atrazin-rezisztens biotípusok mellett olyan biotípusokkal is, amelyek paraquat-rezisztenciát ill. paraquat- és atrazin- együttes rezisztenciát is mutatnak. Így tehát ebből a fajból rendelkezünk olyan biotípusokkal, amelyek szenzitívek mindkét herbicidre (S), ill. rezisztensek atrazinra (AR) ill. paraquatra (PQR), valamint olyanokkal is, amelyek egy növényen belül hordozzák mindkét rezisztenciára vonatkozó tulajdonságot (PQAR). Így bármely herbicid-rezisztenciára vonatkozó tulajdonságot is kívánjuk vizsgálni, azonos nevelési és kísérleti körülmények között az eredmények kiegészítik egymást. Az atrazin-rezisztens *Conyza canadensis* (L.) Cronq biotípusokban (AR, PQAR) az atrazin-rezisztenciára jellemző D<sub>1</sub> protein Ser<sub>264</sub>- Gly<sub>264</sub> aminosav mutációja kimutatható, amit a psbA gén vizsgálatával igazoltak is (Gawronski et al. 1992).

Általában elmondható, hogy a vizsgálatokhoz használt növények növényházi körülmények közt csíráztak és növekedtek egészen tölevélrózsás korukig. Téli időszakban azonban a fóliasátor helyett növénynevelő kamrákban helyeztük el a növényeket. Vizsgálatainkhoz 8-10 cm átmérőjű tölevélrózsás egyedeket használtunk fel. A kísérleteinket a legtöbb esetben in vivo, intakt leveleken végeztük, néhány esetben tértünk csak el ettől (ezt külön jelzem).

Az általunk használt *Conyza canadensis* atrazin-rezisztens biotípusa 1000-nél nagyobb atrazin-rezisztencia faktoral rendelkezik, amit az izolált tilakoidokon mért Hill-reakció segítségével határoztak meg (Lehoczki et al. 1984). A paraquat-rezisztens biotípusok 170-s (PQR) ill. 650-s (PQAR) paraquat-rezisztencia faktoral rendelkeznek. A rezisztencia faktor értékeket a változó fluoreszcencia 50%-os gátlásához szükséges herbicid koncentrációk hányadosa alapján határoztuk meg.



## II.2. Vizsgálatokhoz használt berendezések, műszerek

Vizsgálataink során a pigmentanalízishez HPLC-t ill. spektrofotométer, a funkcionális vizsgálatokhoz hagyományos és modulációs elven működő fluoreszcencia indukciómérőt, oxigén polarográfias módszert és termolumineszcencia-mérő berendezéseket használtuk.

### II.2.1 Pigment analízis

A gyors pigmentösszetétel vizsgálatoknál a pigmenteket 80%-os acetonban vontam ki és centrifugálás után Lichtenthaler (1987) módszere szerint határoztam meg. A részletes pigmentösszetétel, valamint a xantofill ciklus pigmentek vizsgálatánál HPLC technikát használtam. Ezek során a növényi mintákat folyékony N<sub>2</sub>-ben fixáltam és tartottam felhasználásig. Utána metanolos kivonást készítettem, ahol többszöri centrifugálással tisztítottam a pigmenteket (50000g, 10 min, 277K). A felülúszót aztán egy 0.45 µm PTFE filteren (Millipore, Bedford, MA, USA) keresztül szűrtem át (hogy a HPLC oszlopra véletlenül se kerüljön növényi szövetdarab), majd N<sub>2</sub> gáz segítségével a növényi mintát szárazra pároltam (hidegen) és ezzel koncentráltam, majd -20°C-on tároltam felhasználásig, vagy azonnal felhasználtam RP HPLC analízisre.

HPLC berendezés: SP 8700 (Spectra-Physics, Darmstadt, Germany) folyadéktovábbító rendszer és pumpa, 50 µl loop-s Rheodyne M7125 (Cotati, CA, USA) injektor, Zorbax C18-s 4,65 nm/25 cmx4,6 mm oszlop (DuPont, Willmington, DE, USA), M991-25 UV-Vis photodiode-array detektor (Waters, Milford, MA, USA).

Oldatok: Az oldatok levegőmentesítését tiszta hélium (Quality U; Air Liquide, Paris, France) átbuborékolásával biztosítottam. A pigmentek szétválasztásához 3 oldat elegyét (acetonitril, metanol, diklorometán) használtam, amelyek összetétele a pigmentek elválasztása során egy meghatározott program szerint változott (1.táblázat; 6.ábra).

Vizsgálataimban a xantofill ciklus pigmentek pontos meghatározása alapvető fontosságú volt és ez szükségessé tette az ezen pigmentek jó szétválását biztosító gradiens program kifejlesztését. Ezt a Foyer et al. (1989) és Schoefs et al. (1995) által használt program továbbfejlesztésével értem el. Az így kifejlesztett program lehetőséget biztosított az egyébként igen problematikus xantofillok (Neo-Vio; Lutein-Zea-c-lutein) jobb feloldású szétválasztására. A program segítségével szétválasztott pigmentek abszorpciós tulajdonságait a 2.táblázatban foglaltam össze.

Oldatok: A: acetonitril. B: metanol. C: diklorometán.

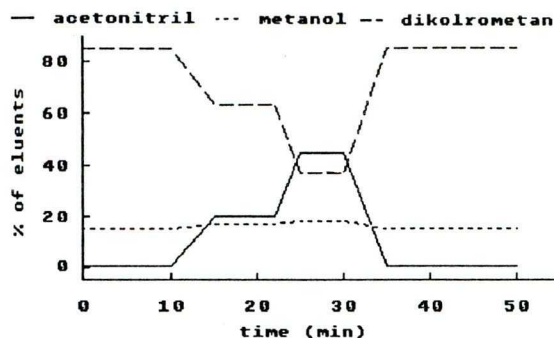


1.táblázat: Gradiens program

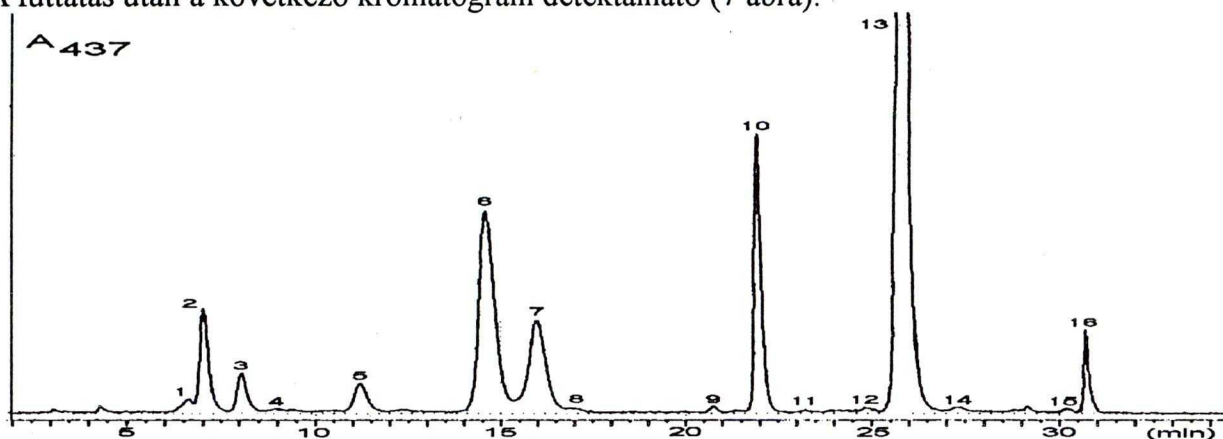
Idő(min)	A%	B%	C%
0-10 i	0,1	14,9	85
10-15 lg	20	17	63
15-22 i	20	17	63
22-25 lg	45	18	37
25-30 i	45	18	37
30-35 lg	0,1	14,9	85
35-50 i	0,1	14,9	85

i=izokratikus futás; lg=lineáris gradiens

6.ábra: A 3 komponens megoszlásának változása a futtatás során.



A futtatás után a következő kromatogram detektálható (7 ábra).



7.ábra: A program szerint futtatott tipikus kromatogram 437 nm-n. (Ezen a hullámhosszon az összes pigment jól látható, de az adatok értékelése már a különböző pigmentek saját abszorpciós maximumaikon történtek.) A példa egy 1500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  fényintenzitáson tartott (1h) *C. canadensis* szenzitív biotípusának kromatogramját mutatja.

2.táblázat: A kromatogram alapján azonosított pigmentek és abszorpciós tulajdonságaik.

Peak No.	Pigment	Abszorpciós maximum	time peak No/ time eluents
1	trans-Neoxantin	413,436,462	0,188±0,016
2	cis-Neoxantin	326,414,438,466	0,200±0,014
3	trans-Violaxantin	416,440,470	0,231±0,013
4	cis-Violaxantin	328,408,434,464	0,257±0,014
5	trans-Anteraxantin	424,447,476	0,32 ±0,015
6	trans-Lutein	424,447,476	0,417±0,014
7	Zeaxantin	450,478	0,457±0,013
8	cis-Lutein	331,415,444,470	0,486±0,015
9	Klorofill-b'	464,648	0,606±0,014
10	Klorofill-b	464,648	0,617±0,013
11	Klorofill-b''	464,648	0,663±0,014
12	Klorofill-a'	430,664	0,708±0,012
13	Klorofill-a	430,664	0,737±0,014
14	Klorofill-a''	430,664	0,78±0,013
15	Feofitin	410,667	0,862±0,015
16	$\beta$ -Karotin	420,457,486	0,874±0,014



Megjegyzem azonban, hogy az anteraxantin sötétadaptált, vagy gyenge fényintenzitáson tartott növényi mintákban normál fiziológiás körülmények között csak nyomokban kimutatható, a zeaxantin csak a xantofill ciklus működése során képződve figyelhető meg. Ugyanakkor pl. magas fényintenzitású kezelésekkor, jelentős mennyiségű anteraxantin és zeaxantin lehet jelen (7.ábra).

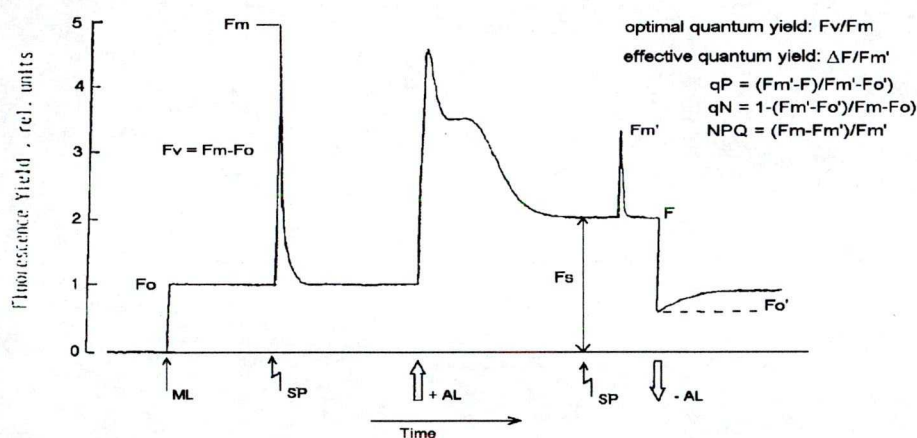
## II.2.2 A klorofill-fluoreszcencia indukció és quenching analízis mérések

A fluoreszcencia intenzitás változására hagyományos és modulációs elven működő fluoreszcencia indukciómérő berendezések is a rendelkezésünkre álltak. Számos vizsgálat esetében a korrekt és megbízható eredmények érdekében nem volt feltétlenül szükséges a modulációs elven működő fluoriméterek használata, viszont a nagyszámú és gyors mintavételezést e műszer jobban elősegítette. Így a paraquat-kezelés hatására a változó fluoreszcencia (Fv) intenzitásának detektálását még a hagyományos technikákkal, a quenching analíziseket viszont már a modulációs elven működő fluoriméterek segítségével végeztük el. A hagyományos mérésekhez a JATE Növénytani Tanszéki Kutatócsoportban kifejlesztett digitális fluorométert használtuk. A mérőfej tartalmaz egy hármás elágazású fényvezető köteget, melyből kettő a gerjesztő fény mintára vezetésére, egy a fluoreszcencia jel elvezetésére szolgál. A fényforrás egy speciális,  $659\pm 15\text{nm}$  hullámhosszú,  $180\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\ \text{s}$  kimeneti fényintenzitású fénydióda (LED, TLRA,150C,Toshiba). A fluoreszcencia jel egy RG9-s szűrőn keresztül jut el a detektorba (BPX 60, Siemens fotodióda). A mérés vezérlése, a fluoreszcencia jel detektálása és feldolgozása egy GEA Persona GLT-216A típusú számítógép segítségével történik.

A modulációs elven működő méréseket egy Hansatech gyártmányú Dual Chanel Modulated Fluoriméter segítségével végeztük. A mérés vezérlését és az adatok kiértékelését egy saját fejlesztésű software segítségével oldottuk meg. A mérés során a sötétadaptált mintát először egy gyenge modulált mérőfényvel (ML) világítjuk meg, amely a fluoreszcencia gerjesztésére szolgál és jelen esetben  $8\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\ \text{s}$  maximális fényintenzitású, 4,8 kHz frekvenciájú és  $583\pm 40\text{nm}$  hullámhosszúságú. A modulált fény hatására indukálódó fluoreszcencia a mérőfényvel azonos frekvenciájú, így annak detektálása ( $13,6\ \text{mm}^2$  aktív felületű PIN fotodióda) a modulált fény frekvenciájára hangolt elektronikával megoldható. A mérőfény intenzitását úgy állítjuk be, hogy intenzitása nem elegendő a fotokémiai reakciók beindításához, primer töltésszétválasztás indukálásához, így az ekkor mért fluoreszcencia intenzitás az  $F_0$  fluoreszcenciával egyezik meg. Ezután egy telítési fényimpulzust (SP) (1s, fehér  $2500\ \mu\text{mol}/\text{m}^2$



s fényintenzitású, Hansatech PLS1) adva az összes  $Q_A$ -t redukált állapotba hozzuk, így a fluoreszcencia jel intenzitása maximális lesz ( $F_m$ ). Majd folyamatos a fotoszintézist aktiváló fényel (AL) (általában fehér fényt használtunk, neutrális szűrők segítségével beállított fényintenzitáson, Hansatech LS2) megvilágítva a mintát a lassú indukciós görbe detektálható. Az indukciós görbe tetszőleges pontján adott telítési fényimpulzus segítségével létrejövő fluoreszcencia növekedés mértékéből következtetni lehet a fotokémiai és nem-fotokémiai kioltások mértékére (8.ábra). A fotokémiai kioltás ( $q_P$ ) arányos lesz a fényimpulzusra létrejövő fluoreszcenciaintenzitás-növekedéssel, a maximális fluoreszcenciához hiányzó hányad pedig a nem-fotokémiai ( $q_N$ ) kioltás részarányáról tanúskodik. A flash-k és az aktiváló fény kikapcsolása után a fluoreszcencia szint ismét leesik, általában az  $F_o$  szint alá. Az így kapott minimális fluoreszcencia szintet nevezzük  $F_o'$ -nak (8.ábra). Így tehát a quenching analízisek során van Kooten és Snel (1990) nomenklatúráját követve a következő paraméterek mérhetőek, illetve számolhatóak:



**8.ábra:** Egy tipikus quenching-analízis regisztrátuma, az ebből számolható ( $F_v/F_m$ ,  $q_P$ ,  $q_N$ ,  $NPQ$ ,  $\Delta F/F_m'$ ) paraméterek feltüntetésével.

(Megjegyzem, hogy az  $NPQ$  (sugárzás nélküli energia disszipáció) paramétere a nem fotokémiai kioltás eltérő módon számolt formája, melynek előnye, hogy nem tartalmazza az  $F_o'$  paramétert.)

A nem-fotokémiai kioltási komponensek szétválasztásának egyik lehetséges módszere az egyes komponensek időállandóinak eltérésén alapul. A leggyorsabban megjelenő és megszűnő komponens a  $q_E$  ( $t_{1/2}=1$  min) (intratilakoidális pH változással összefüggő folyamatok), majd ezt követi a  $q_T$  ( $t_{1/2}=5$  min) (state átmenetek) és végül a leglassabban kialakuló és eltűnő komponens a  $q_I$  ( $t_{1/2}=20$  min) (a fotoszintetikus apparátus károsodásával összefüggő



folyamatok). Ezen komponensek megszűnésében megfigyelhető időbeli különbségek alapján lehetőség van a 3 komponens szétválasztására azáltal, hogy megvilágítás után sötétben tartott mintán időnként telítési fényintenzitású flash-t adva a fluoreszcencia jel intenzitása fokozatosan közelít a sötétadaptálás után mért maximális fluoreszcencia értékhez (Horton and Hauge 1988; Quick and Stitt 1989; Walter and Horton 1991). A különböző módszerek eltérő hibalehetősége miatt gyakran a  $q_N$ -t csak egy gyorsan és egy nem vagy csak lassan relaxálódó komponensre szokták bontani (2 komponens) (van Wijk and van Hasselt 1993). Mivel azonban a  $q_T$  csak igen kis részarányt képvisel a  $q_N$ -t meghatározó folyamatokban, ennek elhagyása (ill. besorolása a másik két komponens valamelyikébe) a folyamatok lényegi tendenciáját nem változtatják meg. (Problémát csak akkor jelent, ha épp erre a komponensre vagyunk kíváncsiak.) Lehetőség van a nem-fotokémiai komponensek meghatározására a  $q_N$ -hez hasonló NPQ paraméter segítségével is (Johnson et al. 1993). Vizsgálataink során a quenching analízisek, illetve az ehhez kapcsolódó relaxációs kinetika felvétele szobahőmérsékleten és normál légköri  $CO_2$  tartalom mellett történtek.

### II.2.3. Infravörös gázanalízis

A  $CO_2$  gázcsere mérése ADC-gyártmányú, LCA-2 típusú infravörös gázanalizátort (Analytical Development Co. LTD., Hoddenson) segítségével nyílt rendszerben történt. A gázáramlás 300 ml/min sebességű volt.  $CO_2$  gázcsere mérések fényintenzitás függvényében történtek, ahol a fotoszintézist aktiváló fény intenzitása 100 és 1100  $\mu\text{mol/m}^2$  s között változott. Adott fényintenzitáson a nettó  $CO_2$  fixálás értékét von Caemmerer és Farquhar (1981) által megadott képletek szerint 20 perces adaptáció után határoztuk meg.

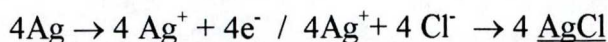
### II.2.4. Oxigén polarográfias berendezés

A fotoszintetikus aktivitás egyik igen gyakran használt direkt módszere a fényindukált oxigénfejlődés mérése oxigén polarográfiával. Ennek során a Pt katód és az Ag anód között egy KCl „hid” segítségével feszültség hatására elektronvándorlás indul meg a két elektród között, amit az  $O_2$  redukciója „zár”. Ekkor a molekuláris oxigén a Pt elektródon (katód) elektronok felvételével redukálódik a következő egyenletek szerint,



miközben az anódon az





egyenletnek megfelelő folyamatok játszódnak le. A rendszeren átfolyó áram erőssége arányos lesz a közegben lévő oxigén parciális nyomásával, amit egyszerű regisztráló segítségével feszültség formájában detektálni tudunk. A különböző típusú (Joliot, Clark) elektródok lehetővé teszik a gyors ill. lassú jelek detektálását. Az előbbi segítségével flash indukálta oxigén kiválasztás mérhető, míg az utóbbi inkább folyamatos megvilágítás esetén alkalmazható.

## II.2.5. Termolumineszcencia-mérő berendezés

A termolumineszcencia jel detektálása relatíve egyszerű berendezés segítségével megvalósítható. Az általam végzett vizsgálatokat házi készítésű berendezések segítségével végeztem Párizsban Dr JM. Ducruet, valamint Lille-ben Pr Y. Lemoine laboratóriumában. A készülékek hőmérséklet szabályozása egy házi készítésű hőmérséklet szabályzó és egy Peltier lap segítségével oldották meg, oly módon, hogy a számítógép által beprogramozott hőmérsékleteket egy termoelem 0,3 másodpercenként ellenőrizte és a mért értékeket a számítógép számára továbbította. Így a valóságos ( $T_r$ ) és programozott ( $T_p$ ) hőmérséklet összevetésével a fűtési áram gyorsan szabályozható, ami kis hőmérséklet ingadozásokat biztosít a készülék számára. A hőmérséklet szabályzó, valamint Peltier lap alatt keringő folyadék ill. a folyékony  $\text{N}_2$  (készüléktől függően) lehetővé teszi a lap gyors (3-10s) hűtését és alacsony (min  $-15^\circ\text{C}$  ill.  $< -80^\circ\text{C}$ ) hőmérsékleten való tartását. A növényi mintát a Peltier lap felületére helyeztük. A jó kontaktus biztosítása érdekében a kettő közé kevés vizet (50-100  $\mu\text{l}$ ) tettünk. A minta felett egy Pyrex üveg és egy gumigyűrű található. A mintatartó elhelyezkedése lehet horizontális vagy vertikális. A minta „felett” helyezkedik el hűtött fotonszámlálóval összekapcsolt fotomultiplier (Hamamatsu R649, RR943-02 ill. H5701-02, Japan), ahová a lumineszcencia jel egy RG 650-s filteren keresztül jut. Mind a vezérlés mind a szabályozás számítógép által megoldott. A program tág határok között tetszőlegesen programozható, mind az előkezelések, mind a hőmérsékleti gradiens beállítása terén. Leggyakrabban  $0,5^\circ\text{C/s}$  sebességű,  $-10^\circ\text{C}$ -tól  $70^\circ\text{C}$ -ig terjedő hőmérséklet gradienst alkalmaztunk, ettől csak a HTL sáv detektálásánál tartunk el ( $0,1^\circ\text{C/s}$ ). Az előkezelések során a beállított hőmérsékleteken különböző számú flash (Xenon ST 103), folyamatos fehér fényű (SCHOTT-KL1500) vagy far red (PAM-Walz FR LED) megvilágításokat végeztünk. A mérési eredmények kiértékelését és feldolgozását szintén külön a termolumineszcencia jel detektálására és feldolgozására szolgáló program segítségével végeztük.



### III. Eredmények és megvitatásuk

---

#### III.1 Herbicid-rezisztens növények fotoszintetikus tulajdonságai

A magasabbrendű növények fotoszintézisének folyamatait a külső környezeti tényezőkön kívül (fény- és hőmérsékleti viszonyok) jelentős mértékben meghatározza a növény fejlődési körülményeitől függően kialakult kloroplasztisz szerveződés, a pigment-lipid-fehérje komplexek szerveződése és összetétele. Ismeretes, hogy számos atrazin-rezisztens növény kloroplasztisz struktúrája (*Brassica napus*, *Br. campestris*), tilakoid-membrán mennyisége és szerveződése, pigment- és lipidösszetétele jelentősen eltér a szenzitív növényétől, s ezek a különbségek már önmagukban jelentős fotoszintetikus aktivitásváltozást idézhetnek elő, például a fényenergia befogásának és továbbításának hatékonyságának, valamint a két reakciócentrum eloszlásának megváltozásán keresztül. A paraquat-rezisztens növények ilyen strukturális tulajdonságokban megnyilvánuló változásait eddig még nem vizsgálták. Ismert az is, hogy ugyanazon növény alacsony vagy magas fényintenzitáson nevelt egyedeinek pigmentösszetétele jelentősen eltér egymástól. Az ún. árnyék-típusú (*shade-type*) növények számára nagyobb fénybegyűjtő antenna komplexre (LHC) van szükség az optimális fotoszintetikus hatékonyság elérése érdekében, mint a fény-típusú (*sun-type*) növényeknél, ami nyilvánul a funkcionális paraméterek megváltozása mellett a pigmentösszetétel és az egész kloroplasztisz struktúra megváltozásában. Ezért a tilakoid-membrán szerkezetének és összetételének ismerete rendkívül fontos a fotoszintetikus folyamatok funkcionális értelmezéséhez.

##### III.1.1 A *Conyza canadensis* szenzitív, atrazin-rezisztens, paraquat-rezisztens és atrazin-paraquat-rezisztens biotípusainak pigmentösszetétele

Növényi mintából kivont pigmenttartalom meghatározás végezhető egyrészt spektrofotometriás módszerrel, amely lehetővé teszi a klorofill a és b, összkarotenoid tartalom meghatározását. E vizsgálatok elegendőek akkor, ha csak arra vagyunk kíváncsiak, hogy van-e szignifikáns különbség a pigmenttartalomban a két minta között. De nem kapunk felvilágosítást az egyes pigment fajták eloszlásáról, vagy olyan funkcionális folyamatokkal összefüggő pigmenttartalom változásokról, mint pl. a xantofill-ciklus működése. Másrészt részletes pigmentanalízis végezhető HPLC technika segítségével, ami alkalmas mindkét feladat megoldására.



Vizsgálataim során HPLC berendezéssel részletes pigmentanalízist végeztem *Conyza canadensis* szenzitív (S), atrazin-rezisztens (AR), paraquat-rezisztens (PQR) és paraquat-atrazin-rezisztens (PQAR) biotípusain olyan fotodiod-array detektor segítségével, amely lehetővé teszi, hogy a HPLC oszlopon a megfelelő oldatok összetételének változtatásával szétválasztódott különböző pigmentek mennyiségét egyszerre, de a saját abszorpciós maximumukon tudjuk meghatározni. Ez azáltal válik lehetővé, hogy a kromatogram felvétele során a detektor egy széles hullámhossz tartományt mér, így a spektrális eloszlás és a kromatikus mintázat egyszerre vehető fel. Ez a mérési lehetőség lényegesen leegyszerűsíti, pontosítja és meggyorsítja a mintavételezést, mivel egyetlen kromatogram magába foglalja több kromatogram felvételét különböző hullámhosszakon, vagy a kromatogram felvétele után az egyes frakciók összegyűjtését és spektrofotometriás vizsgálatát. A mérést követően az eredmények feldolgozása során lehetőség van az egyes pigmentek retenciós idejének, mennyiségének és abszorpciós maximumainak pontos meghatározására (2. táblázat). A kromatogram 2 ill. 3 D-s analízise további információkkal szolgálhat a pontosabb vizsgálatokhoz.

A *C. canadensis* különböző biotípusainak (S, AR, PQR és PQAR) pigmentösszetételének eredményét táblázatos formában foglaltam össze (3. táblázat). Az alapállapotban való összehasonlíthatóság kedvéért a mintákat előzetesen 1 óráig sötétben tartottam, így a xantofill ciklus pigmentjeinek teljes mennyisége violaxantin formájában volt jelen.

A 3. táblázat adataiból kitűnik, hogy nincs szignifikáns különbség az összpigment, az összklorofill (a+b) tartalomban, a klorofill a/b arányban ugyanúgy, mint a legtöbb karotenoid osztályban. Nincs szignifikáns különbség a xantofill pool méretében sem (Violaxantin+Antheraxantin+Zeaxantin). A sötétadaptált növényi mintában a xantofill ciklus pigmentek 98-99%-a violaxantin formában van jelen. Viszont a paraquat-rezisztens biotípusokban (PQR, PQAR) a  $\beta$ -karotin mennyiségének csökkenése jelentős mértékű (3. táblázat).

A különböző biotípusok fotoszintetikus pigmentjeinek összehasonlítása során megállapítható, hogy nincs szignifikáns különbség a pigmentösszetételben, így a különböző biotípusok funkcionális tulajdonságaiban fellelhető esetleges különbségektől nem a betyárkóró különböző biotípusai közti pigmentösszetételbeli eltérés tehető felelőssé. De ugyanez a következtetés vonható le *Chenopodium album* atrazin-rezisztens és szenzitív biotípusainak összehasonlítása során is (az adatokat nem mutatom be).



**3.táblázat:** *Conyza canadensis* különböző biotípusainak pigmentösszetétele. Az eredmények 3 mintavételezés átlagát tartalmazzák.

Pigmentek	S	AR	PQR	PQAR
Neoxantin	7,51±0,88	7,40±0,454	8,01±1,12	7,02±0,5
Violaxantin	19,40±2,6	16,75±2,4	18,26±2,1	16,07±1,9
Anteraxantin	0,766±0,12	0,787±0,06	0,557±0,08	0,761±0,1
Lutein	26,70±3,1	24,7±2,36	23,24±3,0	22,72±2,0
Zeaxantin	0,021±0,001	0,023±0,001	0,024±0,001	0,022±0,001
Klorofill-b	43,70±4,4	44,33±4,46	40,50±3,75	43,79±2,5
Klorofill-a	152,7±11,8	151,4±13,2	145,9±6,5	148,8±13,7
β-karotin	5,68±0,62	5,87±0,72	3,91±0,50	3,98±0,33
Össz pigment	257,5±22,3	251,2±18,9	240,4±13,6	243,2±20,2
Klorofill a+b	196,4±15,6	195,73±17,3	186,4±10,2	192,6±16,4
Kl a/b	3,49±0,457	3,41±0,32	3,6±0,204	3,40±0,34
Össz karotenoid	60,07±6,12	55,53±4,3	53,99±3,86	50,58±4,3
Vio+Ant+Zea	20,19±3,4	17,56±2,45	18,84±2,27	16,86±2,05
Ei	0,980±0,005	0,98±0,002	0,975±0,002	0,974±0,002

Az adatok  $\mu\text{mol pigment/m}^2$  -ben vannak megadva.

$E_i = (\text{Vio} + 0,5 \text{Ant} / \text{Vio} + \text{Ant} + \text{Zea})$

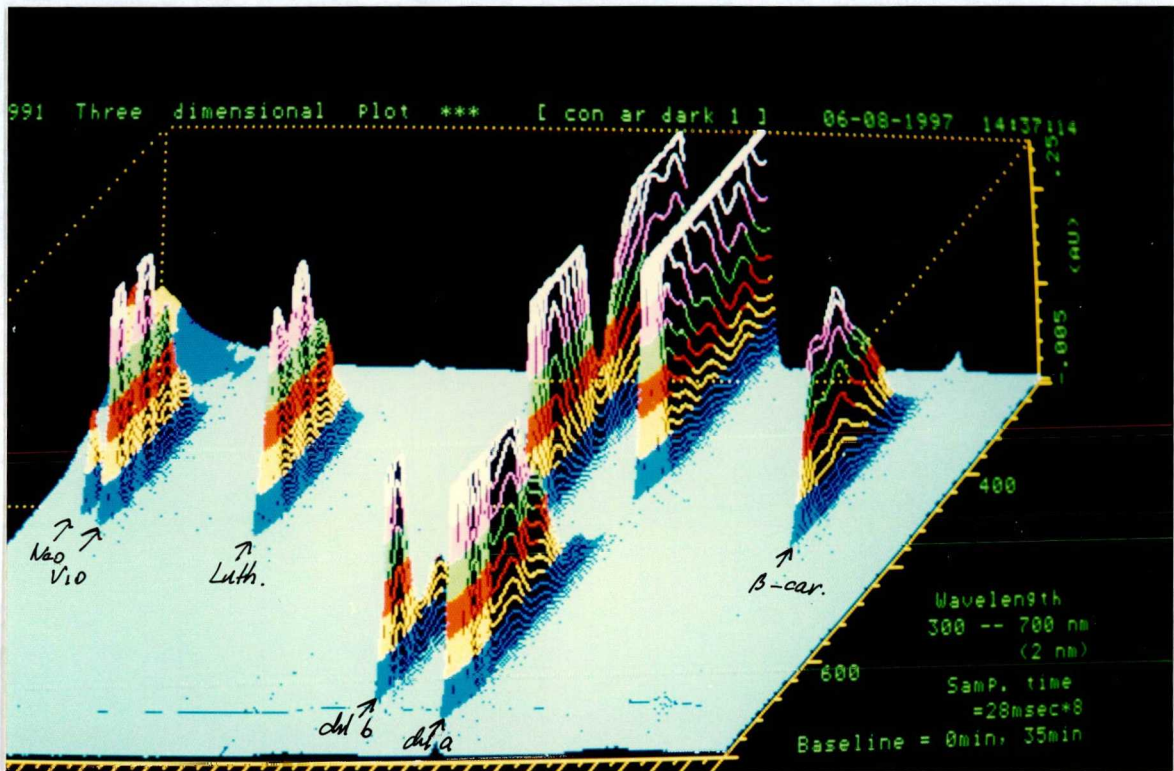
Ezen az alapvető megfigyelésen, miszerint a normál fiziológiás körülmények között a pigmentösszetételben nincs különbség a biotípusok között nem változtat az a körülmény sem, ha a növények közepesen magas, vagy alacsony fényintenzitáson növekednek. A fényintenzitás tartós csökkenésének hatásai megnyilvánulnak a pigmentösszetétel megváltozásában (összklorofill és összkarotenoid tartalom megnövekedése, klorofill a/b arány csökkenése, csökkent xantofill ciklus "pool" méret), de ezek a változások egységesek az összes biotípusra nézve (Darkó et al. 1995). Az árnyékadaptáció hatásai ultrastrukturális szinten is megnyilvánulnak, amit a tilakoid membrán és a gránum régió arányának megnövekedése mutat (Darkó et al. 1995).

A rövid ideig tartó (1h) magas fényintenzitású kezelések a pigmentösszetételt lényegében nem változtatták meg csupán a xantofill ciklus pigmentjeinek eloszlása és a β-karotin mennyisége módosult (Foto A,B,C). Magas ( $1500 \mu\text{mol/m}^2 \text{ s}$ ) fényintenzitáson a violaxantin jelentős része egy átmeneti terméken keresztül (anteraxantin) zeaxantinná alakul, jelezve a xantofill ciklus szerepét a magas fényintenzitások okozta károsító hatások kivédésében (Foto A,B,C). A β-karotin mennyisége mintegy 20, 25%-al csökkent a fénykezelés hatására a paraquat-rezisztens növényekben, és mintegy 42%-al a szenzitív és az atrazin-rezisztens növényeknél. A xantofill ciklus pigmentek (violaxantin→zeaxantin) átalakulásának mértéke kifejezhető többek között az

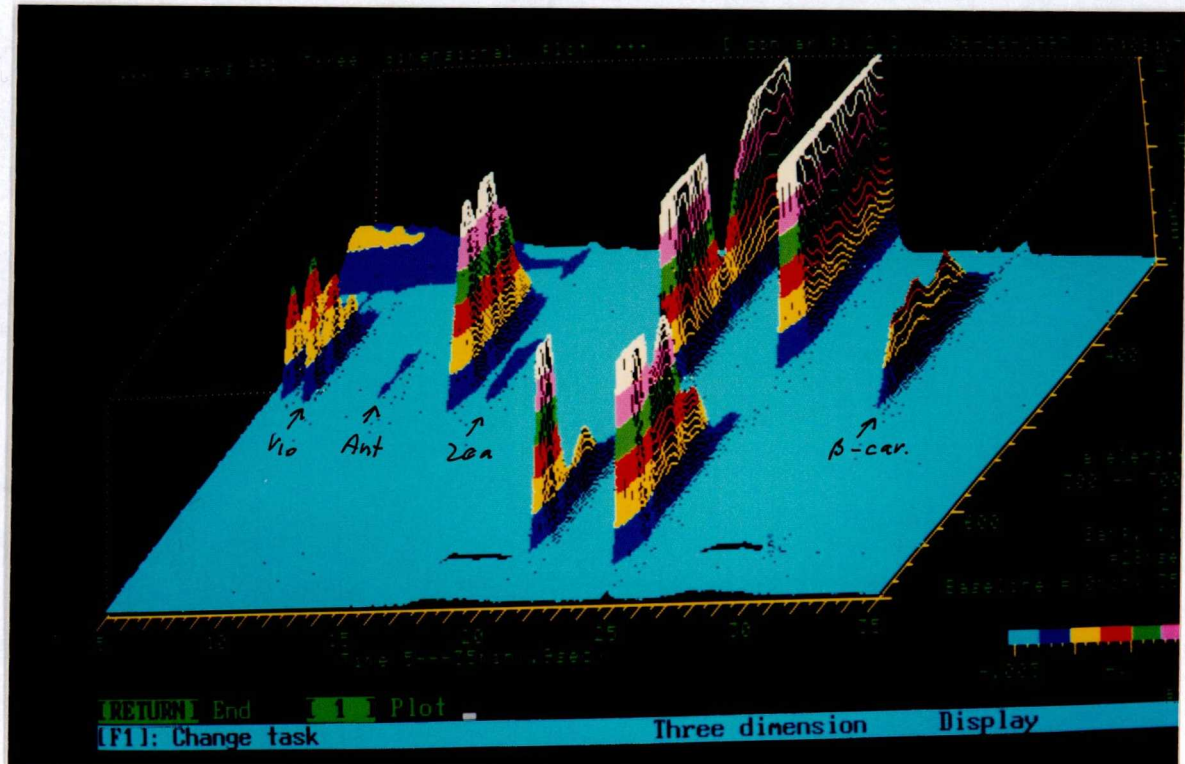


epoxidációs index ( $E_i$ ) segítségével ( $E_i = (V_{io}\% + 0.5Ant\%) / 100$ ) (Thayer and Björkman 1990). Ez az átalakulás az atrazin-szenzitív növények esetében kifejezett ( $E_i = 0,22$  (S) ill.  $0,32$  (PQR)) míg az atrazin-rezisztens növényeknél jóval kisebb mértékű ( $E_i = 0,55$  (AR),  $0,50$  (PQAR)).

**A:** Sötétadaptált atrazin-rezisztens (AR) *C. canadensis* pigmentösszetételének 3D-s kromatogramja. (A pigmentösszetételben a  $\beta$ -karotin mennyisége kivételével nincs szignifikáns különbség az egyes biotípusok között, így azokat külön nem mutatom be).

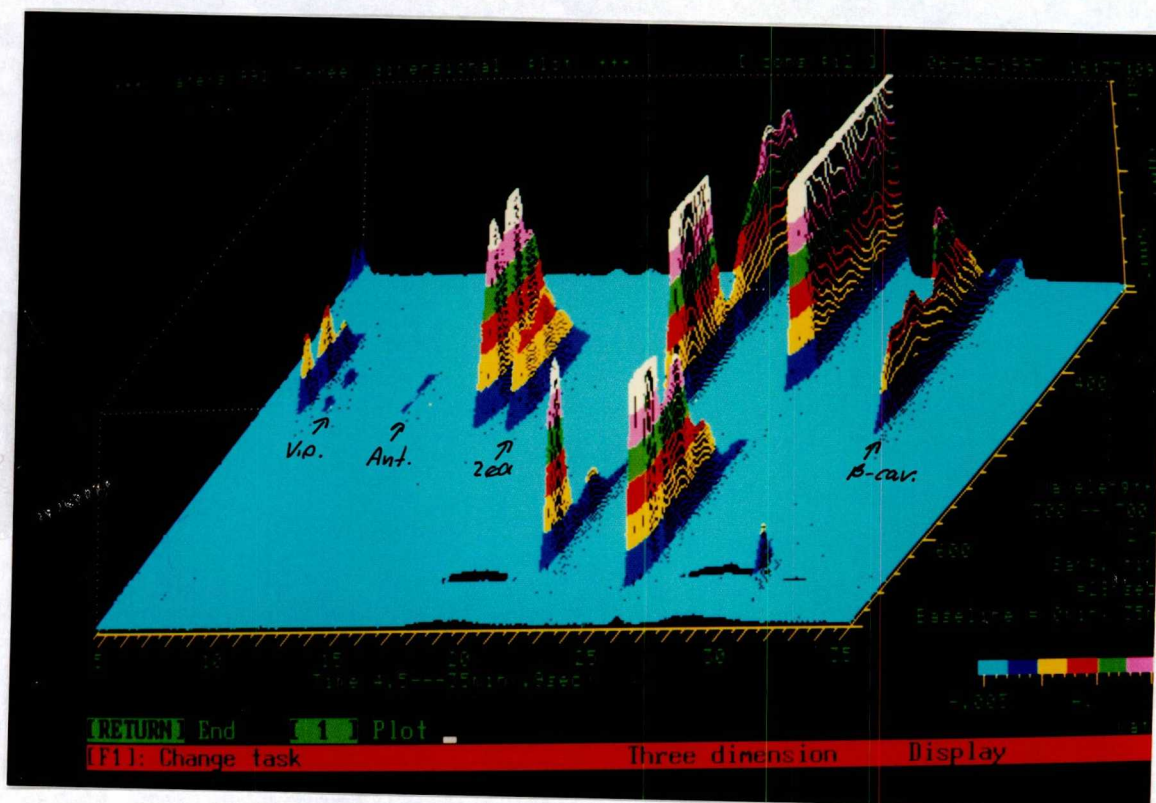


**B:** 1h  $1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2$  s fényintenzitású kezelés hatása a *C. canadensis* atrazin-rezisztens (AR) biotípusának pigmentösszetételére. (A paraquat/atrazin-rezisztens biotípus hasonló képet mutatott, csak a  $\beta$ -karotin mennyisége tért el (lásd szöveg), így azokat külön nem mutatom be).





C: 1h 1500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{ s}$  fényintenzitású kezelés hatása a *C. canadensis* szenzitív (S) biotípusának pigmentösszetételére. (A paraquat-rezisztens biotípus hasonló képet mutatott, csak a  $\beta$ -karotin mennyisége tért el (lásd szöveg), így azokat külön nem mutatom be).



A magas fényintenzitású kezelés hatására tapasztalható  $\beta$ -karotin tartalom csökkenés megfigyelhető *Chenopodium album* atrazin-rezisztens és szenzitív biotípusokon is (saját adat), valamint néhány más esetben (Schubert et al. 1994), noha e jelenségre pontos fiziológiai magyarázat eddig még nem ismert. Az egyik lehetséges magyarázat, hogy a  $\beta$ -karotin oxidatív károsodást szenved (Liebler and Kennedy 1992). Ismert azonban az a tény is, hogy a xantofill ciklus pigmentek prekursora a  $\beta$ -karotin, ami több lépésen keresztül a kloroplasztisz határoló envelope membránban zeaxantinná, majd epoxidálódva anteraxantinná és violaxantinná alakul (Jones and Porter 1979). Az így képződött violaxantin jut be a tilakoid-membránba és az itt elhelyezkedő de-epoxidáz segítségével részt vehet a xantofill ciklus működésében. A de novo zeaxantin és violaxantin képződés feltételezhetően lassú folyamat, így nem valószínű, hogy az 1 órás fénykezelés alatt lejátszódik. Valamint a  $\beta$ -karotin csökkenés ebben az esetben xantofill pool méret megnövekedését eredményezné, ami azonban nem tapasztalható.

Összességében elmondható, hogy a biotípusok között fellelhető különböző természetű funkcionális különbségek oka nem a pigmentösszetétel és a kloroplasztisz struktúra megváltozására vezethető vissza az általam vizsgált a herbicid-rezisztens növények esetében.



### III.1.2 A *Conyza canadensis* szenzitív, atrazin-rezisztens, paraquat-rezisztens és atrazin-paraquat-rezisztens biotípusainak in vivo fotoszintézisének funkcionális jellemzése

A fotoszintetikus folyamatok alapvető funkciói a fényenergia megkötése és továbbítása a reakciócentrumok felé, a fényenergia kémiai energiává történő átalakítása a primer töltésszétválasztás és az elektrontranszport-lánc későbbi komponenseinek töltésstabilizálása révén, az oxigén-kiválasztás a vízbontó rendszer működése következtében, és a CO<sub>2</sub> fixálás. Az in vivo fotoszintetikus folyamatok tanulmányozhatók direkt módon az oxigén-kiválasztás és a CO<sub>2</sub> fixálás vizsgálatán keresztül, valamint indirekt módon az alternatív folyamatokon (fluoreszcencia indukció és quenching analízis) keresztül.

#### A, Fluoreszcencia indukciós vizsgálatok

A betyárkóró biotípusainak in vivo fluoreszcencia indukciós vizsgálatai azt mutatják, hogy a gyors és lassú indukciós görbe alapján a négy biotípus két csoportra osztható, amelyet az atrazin-rezisztencia jelenléte, vagy hiánya határoz meg (9.ábra). A görbék részletes analízise során kimutatható, hogy nincs szignifikáns különbség a fluoreszcencia Fo kiindulási szintje között, ami az azonos pigmentösszetétel miatt várható is volt (4.táblázat). Nincs szignifikáns különbség a fluoreszcencia maximális (F<sub>max</sub>) intenzitásában sem, ami azt mutatja, hogy a PS II reakciócentrumainak fényenergia-befogadásának hatásfoka (F<sub>v</sub>) közel azonos, ami megnyilvánul a primer töltésszétválasztás hatékonyságát, a növény potenciális fotoszintetizáló képességét kifejező optimális kvantumhatásfok (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> paraméter) hasonló értékeiben is (4.táblázat).

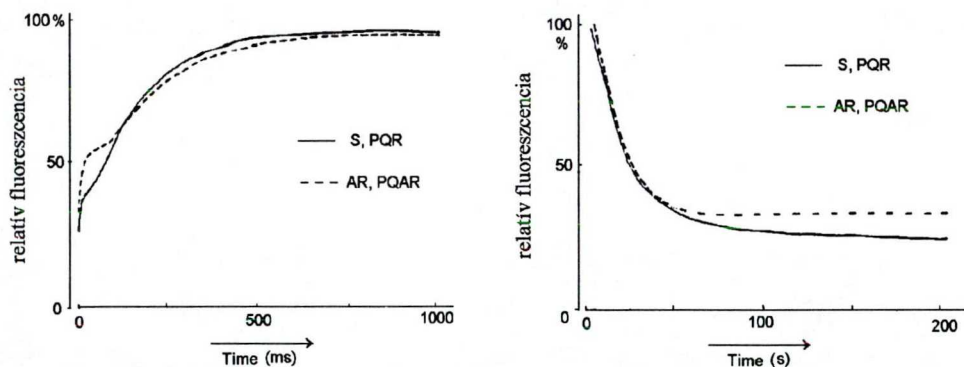
**4.táblázat:** A betyárkóró különböző biotípusainak néhány fluoreszcencia indukciós paramétere. A táblázat 12 minta átlagát tartalmazza.

	S	AR	PQAR	PQR
F <sub>o</sub>	0,206±0,029	0,233±0,042	0,230±0,032	0,212±0,024
F <sub>i</sub>	0,389±0,056	0,553±0,035	0,515±0,045	0,428±0,059
F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>	0,825±0,025	0,793±0,041	0,800±0,039	0,812±0,036
F <sub>i</sub> -F <sub>o</sub> /F <sub>v</sub>	0,24±0,057	0,42±0,042	0,36±0,04	0,24±0,046
R <sub>fd</sub>	2,54±0,24	1,95±0,19	2,18±0,2	2,68±0,026

Az 9.ábrán látható, hogy a bifázikus gyors indukciós görbén megfigyelhető legszembevetőbb különbség az O-I-P szakasz felfutásában van, ami arra utal, hogy a Q<sub>A</sub> igen gyors redukciója és reoxidációja között lényeges eltérés van a két csoport között. Az elektrontranszport folyamatok során a redukált Q<sub>A</sub> igen gyorsan (100-600µs alatt) átadja elektronját a másodlagos



kinon elektronakceptorok, a  $Q_B$ -nek, ezáltal reoxidálódik és képes újabb elektronok fogadására. Ha azonban a  $Q_A^-$  valamilyen oknál fogva nem képes ilyen gyorsan átadni az elektronját a  $Q_B$ -nek, akkor a redukált  $Q_A$  mennyiségének pillanatnyi felhalmozódása figyelhető meg, ami megemeli a fluoreszcencia kisugárzás szintjét. Ezt mutatja az atrazin-rezisztenciával rendelkező biotípusok (AR, PQAR)  $F_i$  fluoreszcencia szintjének megemelkedése (4. táblázat). Ennek oka lehet, hogy a mutáció következtében a másodlagos kinon elektronakceptorok gyengébben kötődnek a D1 protein  $Q_B$  kötőhelyére, ami megnehezíti az elektronátadást a két kinon típusú molekula között. Ez lassítja a  $Q_A$  és  $Q_B$  közötti elektrontranszportot, ami megmutatkozik a gyors indukciós görbe lefutásában. Ugyanakkor a gyengébb kötődés pillanatnyilag megnövelheti azon reakciócentrumok arányát is, ahol a  $Q_B$  nem kötődik a reakciócentrumokhoz, azaz növekedhet a  $Q_B$ -nonreducing centrumok száma, aminek következtében ismét csak nehezebbé válik a  $Q_A$ - $Q_B$  elektronátadás, ami a fluoreszcencia indukciós görbén ugyanazt a fluoreszcencia szint növekedést eredményezheti. Mind a plasztokinon pool-ig terjedő elektrontranszport lassulás, mind a  $Q_B$ -nonreducing centrumok számának megnövekedése megmutatkozik az  $F_i-F_0/F_v$  paraméter magasabb értékeiben (4. táblázat).



**9.ábra:** A betyárkóró atrazin-szenzitív (S,PQR) és atrazin-rezisztens (AR,PQAR) biotípusainak egy tipikus gyors és lassú fluoreszcencia indukciós görbéi.

Folyamatos megvilágítás esetén a maximális fluoreszcencia szint elérése után a fluoreszcencia részben a PS I működésének, részben az ún. nem-fotokémiai kioltó mechanizmusok beindulása miatt csökken és néhány perces megvilágítás után (5-15 min) elér egy egyensúlyi (steady-state) szintet. Ez a szint függ a fényintenzitástól és a növény fiziológiai állapotától. Nagyobb fényintenzitás mellett az abszorbeált fényenergia nagyobb hányadavész el fluoreszcencia kisugárzás formájában ( $F_s$  magasabb), ugyanakkor adott fényintenzitáson a növények rosszabb fiziológiás állapotában kevésbé képesek hasznosítani az elnyelt fényenergiát és ez is  $F_s$  szint növekedést eredményezhet. A különböző biotípusok lassú indukciós görbéinek



összehasonlítása az mutatja, hogy az atrazin-rezisztenciával rendelkező biotípusok steady-state fluoreszcencia szintje szignifikánsan magasabb, mint a szenzitív biotípusoké (9.ábra). Ez egyben azt is mutatja, hogy a kioltási folyamatok (fotokémiai és nem-fotokémiai kioltás) részaránya kisebb a rezisztens biotípusok esetében. Kimutatható továbbá, hogy a fluoreszcencia kioltási folyamatok és a fluoreszcencia sugárzás aránya ( $F_m - F_{ss}/F_{ss}$ ) jól korrelál a növények in vivo fotoszintetikus aktivitásával (Lichtenthaler et al. 1986, 1988; Strasser et al. 1987), ezért ezt a paramétert elnevezték vitalitási indexnek, amit Rfd értékkel jelölnek. Kimutatható, hogy a lassú fluoreszcencia indukciós görbe paramétereiből számolt Rfd érték mintegy 30%-al alacsonyabb az atrazin-rezisztens növényekben, mint az atrazin-rezisztenciával nem rendelkező biotípusokban (4.táblázat). Ez a megfigyelés összhangban áll más szerzők Sencio vulgaris atrazin-rezisztens és szenzitív biotípusainak  $CO_2$  fixálással és  $O_2$  kiválasztással mért alacsonyabb fotoszintetikus aktivitásával (Holt et al. 1981; Ireland et al. 1988).

Így a sötétadaptált növényi mintákon végzett fluoreszcencia indukciós vizsgálatok egyértelműen mutatják, hogy az atrazin-rezisztens növényekben a mutáció következtében erősen lelassult a  $Q_A - Q_B$  közti elektronátadás folyamata, ami a  $Q_A^-$  relatív arányának megnövekedéséhez vezet. Mivel azonban a teljes fotoszintetikus elektrontranszport folyamatok sebességét a fotoszintetikus elektrontranszport-lánc későbbi komponensei limitálják, feltételezhető, hogy az atrazin-rezisztens növényekben e tényezőkön kívül más funkcionális folyamatok is módosultak, amelyek kihatással vannak a fluoreszcencia indukciós görbe lassú komponensére is.

## **B, Termolumineszcencia vizsgálatok**

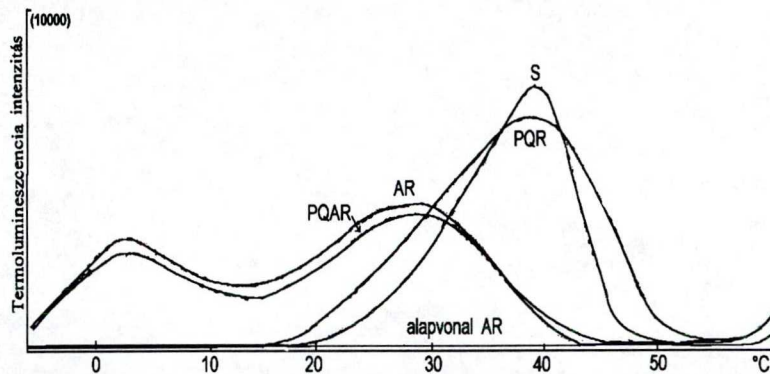
A PS II funkcionális vizsgálatának másik lehetséges módja a termolumineszcenciás vizsgálatok, amelyek az akceptor oldali működés mellett felvilágosítást adnak a PS II donor oldali (vízbontó-rendszer) működéséről is, hiszen e fluoreszcencia kisugárzási forma a már előzetesen szétvált töltéspárok rekombinációjából ered.

A *C. canadensis* különböző biotípusainak intakt leveleken sötétadaptálás után mért termolumineszcencia görbéi megerősítik a már korábban izolált kloroplasztiszokon megfigyelt jelenségeket (Demeter et al. 1985). Ugyanakkor számos új eredménnyel is kiegészítik azokat.

A szenzitív és paraquat-rezisztens növényekben 1 flash hatására egy éles sáv jelenik meg  $35^\circ C$  körül, ami az  $S_2/S_3Q_B^-$  (1 flash-re főleg  $S_2Q_B^-$ ) rekombinációjából származó lumineszcencia intenzitás növekedésével hozható kapcsolatba (10.ábra). Ugyanezen faj szenzitív és atrazin-



rezisztens biotípusainak izolált kloroplasztiszain végzett kísérletekkel összhangban ezekben a vizsgálatokban is megfigyelhető az atrazin-rezisztens növények (AR, PQAR) B sávjának alacsonyabb hőmérsékletek felé tolódása. Ezt a jelenséget Demeter és mtsai a  $Q_B/Q_B^-$  középponti redoxpotenciáljának eltolódásával értelmezték (Demeter et al. 1985).



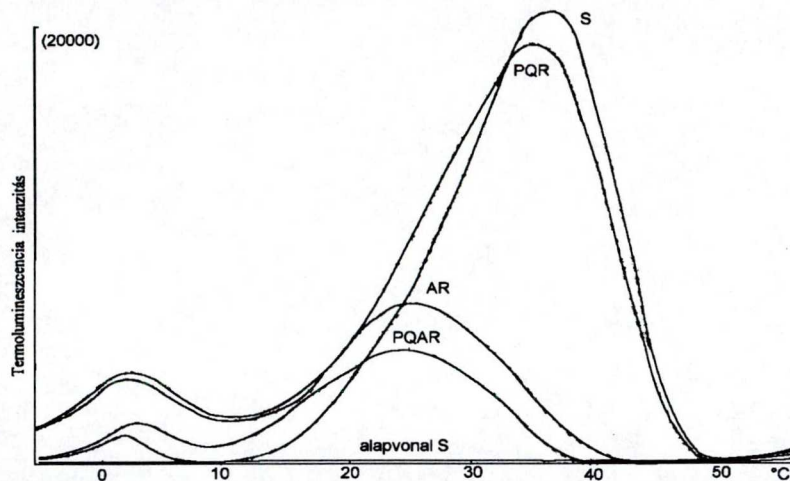
**10.ábra:** Sötétadaptált (30 min) *Conyza canadensis* különböző biotípusainak  $-10^{\circ}\text{C}$ -on, 1 flash hatására képződő tipikus termolumineszcencia görbéi  $-10^{\circ}\text{C}$ -tól  $70^{\circ}\text{C}$ -ig  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{s}$  sebességgel történő felvétel során.

Intakt leveleken az is megfigyelhető, hogy a B sáv intenzitása kisebb az atrazin-rezisztens növényekben, ami annak a következménye lehet, hogy a mutáció következtében a  $Q_B$  affinitása a plasztokinon kötőhelyre lecsökken, megnövelve ezáltal a redukált  $Q_A$ -k arányát, ugyanakkor csökkentve a redukált  $Q_B$ -k mennyiségét, így a rekombinálódni képes töltéspárok számát. Érdekes megfigyelés az is, hogy az intakt leveleken alacsonyabb hőmérsékleten ( $0^{\circ}\text{C}$  körül) egy kisebb sáv is megfigyelhető az atrazin-rezisztens növényekben (10.ábra). Ez in vitro izolált rendszerekben nem tapasztalható herbicid kezelés nélkül.

Két flash hatására a lumineszcencia jel intenzitása megemelkedik, mivel egyrészt az  $S_2$  állapotok mellett az  $S_3$  állapotok is részt vesznek a termolumineszcencia jel kialakításában, másrészt feltételezhetően a sötétadaptálás során a plasztokinon pool egy része redukált állapotban maradt (Inoue 1996). Az atrazin-szenzitív (S, PQR) és atrazin-rezisztens (AR, PQAR) növények B sáv intenzitásának összehasonlítása azt mutatja, hogy a szenzitív biotípusokban e sáv intenzitása szignifikánsan nagyobb az atrazin-rezisztens biotípusokéhoz képest (11.ábra). Az intenzitásnövekedés mellett 2 flash hatására a B sáv hőmérsékleti maximuma kissé alacsonyabb hőmérsékleteken jelentkezik, mint 1 flash után ( $T_{mS1fl}=37,7\pm 1,22$ ;  $T_{mS2fl}=35,1\pm 1,18$ ;  $T_{mAR1fl}=26,4\pm 1,82$ ;  $T_{mAR2fl}=23,5\pm 1,3$ ). Ennek oka lehet, hogy 2 flash hatására az  $S_2Q_B^-$  és  $S_3Q_B^-$  sávok keveredése nagyobb valószínűségű. Két flash hatására az atrazin-rezisztens növényekben az alacsony hőmérsékleten ( $0-5^{\circ}\text{C}$ ) megfigyelhető sáv intenzitása is megnő, de hőmérsékleti maximuma nem változik jelentősen.



Az 1 flash-re adott lumineszcencia sugárzással ellentétben a szenzitív növényekben in vivo leveleken mérve 2 flash hatására egy nagyon kis intenzitású sáv az atrazin-rezisztens növényekhez hasonlóan alacsony hőmérsékleten szintén megjelenhet (11. ábra).



**11. ábra:** Sötétadaptált (30 min) *Conyza canadensis* különböző biotípusainak  $-10^{\circ}\text{C}$ -on, 2 flash hatására képződő tipikus termolumineszcencia görbéi  $-10^{\circ}\text{C}$ -tól  $70^{\circ}\text{C}$ -ig  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{s}$  sebességgel történő felvétel során.

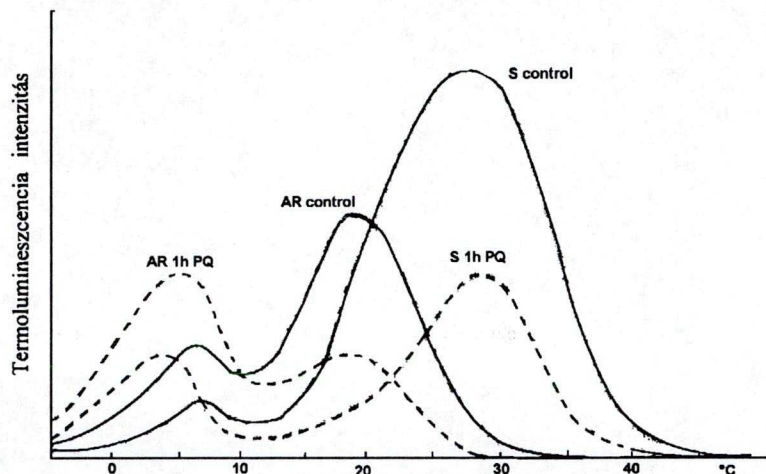
Ez a jelenség in vivo megfigyelhető a betyárkórón kívül *Chenopodiumon*, spenót és borsó leveleken is (az adatokat nem mutatom be).

Bár ismert, hogy fagypont körül a Q sáv található, az atrazin-rezisztens növényekben alacsony hőmérsékleten megfigyelhető sávnak az eredete kérdéses. Először arra gondoltunk, hogy a B sávnak egy újabb alacsonyabb hőmérsékletre való tolódásából származik a lumineszcencia intenzitás növekedés, vagy pedig a készülék elektronikai tulajdonságai hoznak létre ilyen „artefaktumokat”, mivel 2 flashre a szenzitív növényekben is megfigyelhető egy igen kis intenzitású jel. A vizsgálatok során kiderült, hogy a sötétadaptált szenzitív és rezisztens növényről flash kezelés nélkül felvett görbéi nem adnak jelet ebben a hőmérsékleti tartományban (lásd alapvonal, 10., 11. ábra), valamint a fotomultiplier hőmérséklet érzékenységének elektronikus vizsgálata is kizárta az artefaktum létezését. A Q sáv in vivo létezésének gyanúját megerősítették azok az irodalmi adatok is, melyek szerint in vivo speciális körülmények között e sáv megfigyelhető (Farineau 1993). Kimutatták, hogy magas fényintenzitású kezelések hatására e sáv intenzitása megnő és a sötétadaptálás után csak lassan szűnik meg. További megerősítést adott e sáv létezésére a paraquat kezelés hatására történt vizsgálatok. Paraquat kezelés hatására a paraquat elektrontranszport stimuláló tulajdonságának köszönhetően ugyanis a B sáv intenzitása jelentős mértékben csökkent mind a szenzitív, mind az atrazin-rezisztens növényekben (lásd III. 3.2 fejezet). Ugyanakkor az is megfigyelhető volt,





hogy paraquat kezelés hatására a Q sáv intenzitása kisebb mértékben változott, és nem követte a B sáv változásának tendenciáit, hanem sokszor éppen vele ellentétesen, intenzitása megemelkedett (12.ábra).



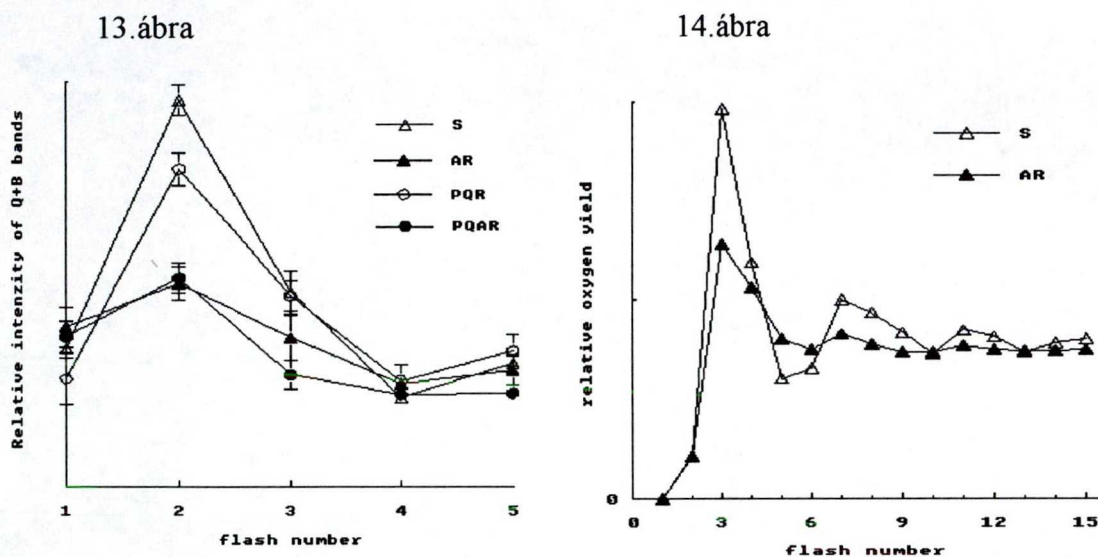
**12.ábra:** Kontroll és 1h paraquat kezelt *Conyza canadensis* szenzitív és atrazin-rezisztens biotípusainak 2 flash hatására (-10°C-on) képződő tipikus termolumineszcencia görbéi 15 perces sötétadaptálás után.

E sávnak a B sávtól való eltérő viselkedése is azt sugallja, hogy itt egy más természetű sávról van szó. Mind magas fényintenzitású kezeléseknél, mind paraquat kezelésnél jelentős mértékben megnövekedhet a PS II funkcionálisan inaktív reakciócentrumainak száma, ami hozzájárulhat a PS II non-reducing centrumainak számának megnövekedéséhez. Ilyen esetekben a  $Q_B$  nem kötődik a reakciócentrumhoz, így töltésszeparáció során csak  $S_2Q_A^-$  rekombináció jöhet létre. Ez viszont a B sávnál alacsonyabb hőmérsékleten megfigyelhető Q sáv megjelenését eredményezheti. Ezen elképzelés szerint jól értelmezhető az atrazin-rezisztens növények fotoszintetikus tulajdonságai is. Egyrészt a  $Q_A^-Q_B^-$  egyensúlyi állandó eltolódása miatt megnő a redukált  $Q_A$ -k aránya, ami csökkenti a B sáv intenzitását, ugyanakkor megnövelheti az  $S_2Q_A^-$  rekombinálódásának valószínűségét. (Ez fluoreszcencia decay kinetikai vizsgálatokkal igazolható volt (Váradi et al.1994)). Másrészt ismeretes, hogy az atrazin-rezisztens biotípusok inaktív reakciócentrumainak száma is nagyobb, mint a szenzitív biotípusoké, ami szintén hozzájárulhat a Q sáv megjelenéséhez és a szenzitív növényekétől nagyobb arányához. (Ort et al. 1983). Sötétadaptálás után a plasztokinon pool egy része redukált állapotban maradhat, amit az is bizonyít, hogy a 2. flashre adott termolumineszcencia jel intenzitása nagyobb, mint 1 flash-re (lásd I.3.4 fejezet). Ennek hatására a redukált kinont tartalmazó reakciócentrumok 1 flash után két elektront tartalmaznak, amelyek két proton felvétele után leválnak a D1 proteintről és egy újabb oxidált kinon kötődik be. A szenzitív



növényekben a két flash-re adott kis intenzitású Q sáv megjelenésének oka lehet, hogy ha a 2. flash éppen akkor éri a reakciócentrumot, amikor az első flash után a  $Q_B$  éppen leválik a reakciócentrumról, akkor az oxidált  $Q_B$  bekötődéséig a  $Q_A$ -n tárolódik az elektron. A csapdázódás miatt létrejöhetnek  $Q_A$ -ról történő rekombinálódások is, annak ellenére, hogy a  $Q_A \rightarrow Q_B$  elektronátadás időállandója ezt kis valószínűségűvé teszi.

Ismeretes, hogy különböző számú flash-k hatására a termolumineszcencia jel intenzitása az oxigénkiválasztó rendszer működéséhez hasonlóan 4-es periodikus oszcillációt mutat, amire ráépül a PS II akceptor oldali  $Q_B$  2-es periódusú oszcillációja is (Inoue 1996 Table 2; Fig3.). A betyárkóró különböző biotípusainak flash sorozatra adott termolumineszcencia jel intenzitása is követi az irodalomban leírt oszcillációt, 2. flash-re adva maximális jelet (13. ábra).



**13. ábra:** Flash sorozat (1-5) indukálta Q+B sáv intenzitásváltozása a *Conyza* különböző biotípusain. A flash-eket 1s időközönként  $-10^{\circ}\text{C}$ -on adtuk. Az eredmények 5 független mérés átlagát tartalmazzák.

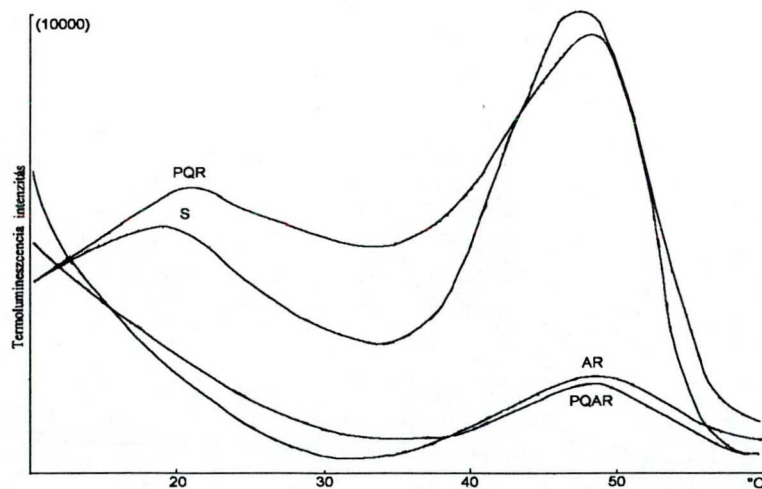
**14. ábra:** Oxigén kiválasztó rendszer flash indukálta ( $7\mu\text{s}$ , 4Hz) oszcillációja szenzitív (S) és atrazin-rezisztens (AR) *Conyza* kloroplasztiszokon 5 perc sötétadaptálás után. A szuszpenzió klorofill tartalma  $290\mu\text{g/ml}$  volt.

Az 13. ábrán az is látható, hogy az atrazin-rezisztens növényekben a maximális intenzitás jóval kisebb, mint a szenzitív növények esetében és az oszcilláció csillapodása is gyorsabb. Ez arra utal, hogy a PS II akceptor oldali működése mellett a vízbontó rendszer is eltérőképpen működhet ezekben a biotípusokban. Ezt bizonyítja Lehoczki és Butkó *C. canadensis*-n mért korábbi eredményei (14. ábra), valamint *Senecio vulgaris* szenzitív és atrazin-rezisztens biotípusainak oxigén kiválasztó rendszerének flash oszcillációs vizsgálatai (Lehoczki személyes közlése, Holt et al. 1981; Holt et al, 1983). Ezek során kimutatható volt, hogy a mutációval rendelkező biotípusok flash indukálta oxigén-kiválasztás oszcillációs mintázata eltér a szenzitív



biotípushoz képest, ami megnyilvánul az oszcilláció gyorsabb csillapodásában, a „miss-k” és a „double hits-k” eltérő értékeiben, valamint az egyes S állapotok közötti átmenetek időállandóiban, ami a különböző S állapotok eltérő élettartamát eredményezi (Holt et al. 1981; Holt et al, 1983). Kimutatták, hogy a lassabb  $S_0-S_1 \rightarrow S_2$ , valamint a gyorsabb  $S_2-S_1$  átalakulás következtében az  $S_2$  állapotok kisebb valószínűséggel fordulnak elő az atrazin-rezisztens növényekben (Holt et al. 1983). A kisebb mennyiségű  $Q_B^-$  mellett ez is hozzájárulhat a termolumineszcencia jel intenzitásának csökkenéséhez az atrazin-rezisztens növényekben. A redukált  $Q_A$ -k arányának növekedése megnöveli annak valószínűségét is, hogy a második flash zárt reakciócentrumot „ér”, így megnő a back reakciók aránya, ami (amellett, hogy növelheti a Q sáv intenzitását,) növeli a „miss”-k valószínűségét. A nagyobb miss arány pedig megnyilvánulhat az oxigénkiválasztó rendszer oszcillációjának gyorsabb csökkenése mellett a TL jel intenzitásváltozásának gyors csökkenésében is (14. és 13. ábra).

Hosszan tartó sötétadaptálás után távoli vörös fényvel történő megvilágítás 40-50 °C között egy új termolumineszcencia sáv megjelenését eredményezi (AG). A különböző biotípusok összehasonlítása során megállapítható volt, hogy e sávok intenzitása is jelentősen változott attól függően, hogy a növény rendelkezik-e az atrazin-rezisztens növényekre jellemző mutációval, vagy sem (15. ábra).

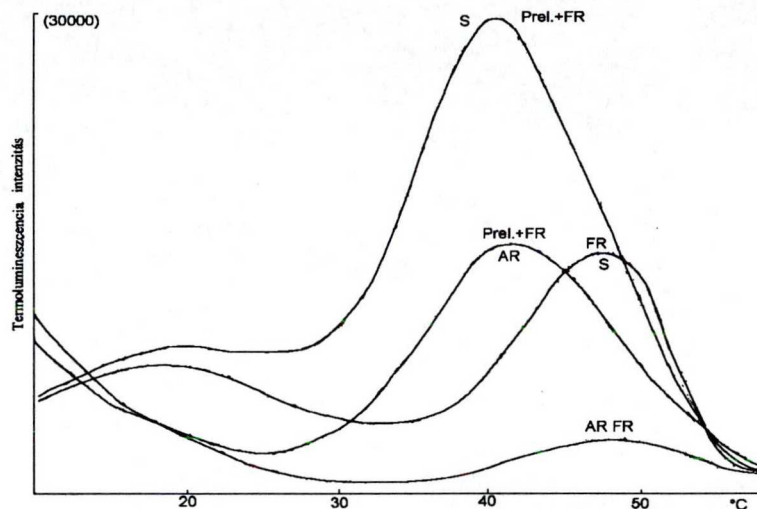


**15. ábra:** Sötétadaptált (1h) *Conyza canadensis* különböző biotípusainak 2°C-on, 30s-os far red megvilágítás hatására képződő tipikus termolumineszcencia görbéi 2°C-tól 70°C-ig 0,5°C/s sebességgel történő felvétel során.

Mint ahogy az 15. ábrán is látható, az atrazin-szenzitív (S, PQR) növények AG sávjának intenzitása lényegesen nagyobb, mint az atrazin-rezisztenciával rendelkezőké (AR, PQAR). E sávok hőmérsékleti maximuma azonban nem tér el szignifikánsan a két csoport között.



Ugyanakkor 20 °C körül egy másik nem túl éles sáv is megfigyelhető a szenzitív növények esetében, amit a B sáv far red kezelés hatására történő alacsonyabb hőmérséklet felé tolódásával magyaráznak (Miranda and Ducruet 1995b). A rezisztens növényekben ez nem figyelhető meg, ami feltehetően abból ered, hogy az atrazin-rezisztens növények eleve alacsonyabb hőmérsékleti maximumainak értékeinek alacsonyabb hőmérséklet felé tolódása már nem detektálható 2 °C-tól történő TL görbe felvétele során. Előzetesen szobahőmérsékleten, fehér fényel (500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ ) történő megvilágítás utáni far red kezelés megnövelte az AG sáv intenzitását, valamint jelentős mértékben eltolta hőmérsékleti maximumainak értékét ( $T_{m_{\text{SFr}}}=47,61\pm 0,89$ ;  $T_{m_{\text{ARFR}}}=48,37\pm 0,62$ ;  $T_{m_{\text{SPrel+Fr}}}=39,87\pm 1,31$ ;  $T_{m_{\text{ARPreI+Fr}}}=42,62\pm 1,42$ ) különösen a szenzitív növények esetében. Ugyanakkor e kezelés mellett az eltolódott B sáv intenzitása változatlan maradt (16. ábra).



**16.ábra:** 1 perc, 500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$  fényintenzitású fehér fényel, 20°C-on történő előkezelés (PreI) hatása a 30 s-os 2°C-on alkalmazott far red (FR) megvilágítás hatására képződő AG sáv intenzitására szenzitív (S) és atrazin-rezisztens (AR) növényen bemutatva. (Egy tipikus görbe)

E kísérlet során az előzetes megvilágítás után 1 perc sötét periódus előzte meg a távoli vörös fénykezelést. Ez lehetőséget biztosított a gyors Q és B sávval összefüggő folyamatok lecsengésére. Feltételezhetően ezzel magyarázható, hogy a B sáv intenzitása nem változott. Ugyanakkor az AG sáv kialakításában ettől jóval tartósabb folyamatok hatásaival kell számolnunk. Ismert, hogy a  $\Delta\text{pH}$ -val kapcsolatos folyamatok erősen befolyásolják az AG sáv intenzitását (Miranda and Ducruet 1995b). Hosszú idejű sötétadaptálás mellett az ATPase működése következtében sötétben is kialakulhat  $\Delta\text{pH}$  a tilakoid membrán két oldala között. Ugyanakkor far red hatására a PS I körüli ciklikus elektrontranszport is hozzájárulhat ehhez.



Mindamellett az AG sáv kialakításában szerepet játszó  $\Delta pH$  eredete még nem teljesen tisztázott. A fehér fényel történő megvilágítás hatására bekövetkező intenzitásnövekedés viszont arra utal, hogy a  $\Delta pH$  megváltozásának fontos szerepe lehet az AG sáv kiváltása szempontjából, viszont ennek eredete nem elsősleges fontosságú.

Az atrazin-rezisztens növények fotoszintetikus tulajdonságainak összehasonlítása során megállapítható volt, hogy a D1 protein mutáció következtében fellépő akceptor oldali változások mellett jelentős módosulások tapasztalhatók a donor oldali működésben is. Ezek a változások megmutatkoznak az oxigén kiválasztó rendszer működésében, a fluoreszcencia indukció paramétereiben és a termolumineszcencia jel tulajdonságaiban is. A fluoreszcencia indukciós görbe gyors komponenseinek módosulása összefügg a  $Q_A^-$  reoxidációjának lelassulásával. Ez a  $Q_A^-$  életidejének megnövekedését eredményezi, ami megmutatkozik a B sáv intenzitásának csökkenésében és hozzájárulhat a Q sáv *in vivo* körülmények közötti megjelenéséhez. Emellett a  $Q_B/Q_B^-$  redoxpotenciáljának eltolódása a korábbi megfigyelésekkel összhangban a B sáv hőmérsékleti maximumának eltolódását eredményezte. A flash sorozatra adott termolumineszcencia jel intenzitásai egyértelműen mutatják a PS II donor oldali működésének megváltozását is. A fluoreszcencia indukciós görbe lassú szakaszának megemelkedése (Fs növekedése) arról tanúskodik, hogy a  $Q_A-Q_B$  közötti elektrontranszport folyamatok lelassulása mellett a teljes elektrontranszport-lánc működése is módosul. Ezt sugallja az is, hogy a PS II működésén túlmutató AG sáv intenzitása is eltér a két biotípus esetében.



### III.2 Herbicid-rezisztens növények fényintenzitás-függő folyamatai

A fény-függő fotoszintetikus folyamatok *in vivo* vizsgálatának egyik lehetséges módja a fotoszintetikus apparátus különböző fényintenzitású kezelésekre adott válaszreakcióinak tanulmányozása. Ebben az esetben az egy-egy fényintenzitásra adott válaszreakciók detektálására nem szükséges tartós fénykezelés, leggyakrabban az adott fényintenzitásra jellemző egyensúlyi folyamatok eléréséig tart a mérés. Másik lehetőség, hogy adott, általában magas fényintenzitású kezeléseket vizsgálják az idő-függvényében. Mindkét vizsgálati módszer alkalmas a növények fény-függő folyamatainak tanulmányozására, azonban ezeknél a vizsgálatoknál azt is figyelembe kell venni, hogy a különböző vizsgálati módszereknél más-más molekuláris szintű folyamatok játszódhatnak le. A rövidtávú fénykezelések során a fényintenzitás növekedése indukálhat számos gyorsan aktiválódó fotoszintetikus folyamatot ( $\Delta$ pH változás, xantofill ciklus pigmentek aktiválódása, stb.) ugyanakkor a rövid-távú fénykezelés időtartama nem, vagy csak extrém magas fényintenzitások esetében teszi lehetővé a fotoszintetikus apparátus inaktiválódási, vagy repair ciklusának tanulmányozását. Mivel azonban általában ezekhez a vizsgálatokhoz *in vitro* olyan magas fényintenzitásokat használnak, amelyek normál fiziológiai körülmények között nem léteznek a természetben (Magyarországon egy erős nyári napsütéses napon mérhető maximális fényintenzitás  $2000 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ), ezért az ilyen irányú *in vivo* vizsgálatokat célszerűbb tartósan magas fényintenzitású kezeléseket kinetikai vizsgálatával elvégezni. Az irodalomban mindkét típusú mérési módszerre számos példa található, s mindkét vizsgálatból hasonló következtetések is levonhatók, ezért sok esetben nem egyértelmű, hogy a következtetések milyen molekuláris mechanizmusú folyamatokból származnak. Így én a továbbiakban megkülönböztetem azokat a folyamatokat, amikor a fényintenzitás növekedésére adott rövid idejű válaszreakciókat tanulmányozzuk (a későbbiekben ezeket nevezném fényérzékenységi vizsgálatoknak), azoktól a folyamatoktól amikor a tartósan magas fényintenzitású kezeléseket a fotoszintetikus apparátus károsodását is előidézhetik (fénygátlás folyamatai). Természetesen *in vivo* és természetes körülmények között a két folyamat szorosan összefügghet, hiszen a rövid távú nagyobb fényérzékenység magas fényintenzitáson és hosszú távon a fotoszintetikus apparátus nagyobb mértékű károsodásához vezet. Így a két folyamat gyakran együtt, egymás mellett játszódik le, de más-más molekuláris folyamatok állhatnak a háttérben. Az is belátható, hogy ezen molekuláris folyamatok bármelyikének megváltozása kihatással lehet a többi folyamatra és végső soron megváltoztathatja az egész növény fényvel szembeni viselkedését.



Az eddigi vizsgálatok során kimutatható volt, hogy az atrazin-rezisztens növények fényérzékenysége nagyobb a szenzitív növényekénél (Sundby et al. 1993a; Curwiel et al 1993) ugyanakkor tartósan magas fényintenzitású kezelések során a fotoszintetikus apparátus nagyobb fokú inaktiválódása is megfigyelhető (Hart and Stemler, 1990; Curwiel and van Rensen 1995). Sundby et al. (1993) szerint ennek oka az atrazin-rezisztens növények módosult D1 turnover. Az általuk vizsgált atrazin-rezisztens *Brassica napus* egyedeiben a D1 protein turnover magasabb volt, mint a szenzitív növényekben (Sundby et al. 1993b). Ez magyarázható azzal, hogy a nagyobb fényérzékenység miatt a degradált reakciócentrumok aránya nagyobb az atrazin-rezisztens növényekben, így az ezeket javító repair folyamatok intenzitása is megnő. Ez következménye lehet az atrazin-rezisztens növények nagyobb fényérzékenységének, de nem magyarázza meg, hogy miért nő ezen növények fényérzékenysége és nem ad magyarázatot a fényintenzitás-függő fotoszintetikus quenching paraméterek viselkedésére sem. Így valójában az atrazin-rezisztens növények fényérzékenysége (bár jelenség szinten korábban is ismert volt) még nem megoldott probléma.

A fénygátlás mechanizmusának tanulmányozása során toxikus oxigén gyökök jelenlétét mutatták ki (Asada 1994). Ugyanakkor az is ismert, hogy paraquat kezelés hatására is számos toxikus oxigéngyök képződik, így felvetődött annak lehetősége, hogy a paraquat-rezisztens növényben a paraquat fitotoxikus hatását kivédő mechanizmus szerepet játszhat más, hasonló hatást kifejtő stressztényezőkkel, mint például a magas fényintenzitás okozta károsító hatásokkal szemben is. Jansen et al (1989) paraquat-rezisztens és szenzitív *Conyza bonariensis* vizsgálata során kimutatta, hogy a rezisztens biotípusok toleránsabbak a magas fényintenzitású kezelésekre, mint a szenzitív biotípusok. Ugyanakkor Preston kísérletei ezt nem erősítették meg (Preston et al. 1991).

Ebből a szempontból különösen érdekes lehet egy olyan herbicid-rezisztens növény fényfüggő fotoszintetikus tulajdonságainak összehasonlítása, amely egyszerre mutatja az atrazin-rezisztens növényekre jellemző nagyobb fényérzékenységet és egy a paraquat-rezisztens növényekre jellemző esetleges fénytoleranciát. Erre lehetőséget adott a paraquat és atrazin együttes rezisztenciával rendelkező paraquat-atrazin-rezisztens (PQAR) *Conyza canadensis* vizsgálata.

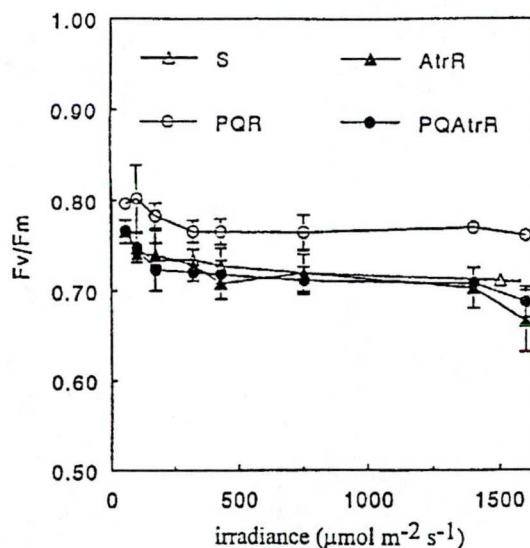
### **III.2.1 Herbicid-rezisztens növények fényérzékenysége**

A fotoszintetikus apparátus fényérzékenységét rövid idejű (15 min), növekvő fényintenzitású kezelésekkkel intakt, a növényről le nem vágott leveleken vizsgáltuk fluoreszcencia quenching analízis, CO<sub>2</sub> fixálás és xantofill ciklus aktivitásának mérésén keresztül a betyárkóró (*Conyza*



canadensis) szenzitív (S), atrazin-rezisztens (AR), paraquat-rezisztens (PQR) és paraquat-atrazin-rezisztens (PQAR) biotípusain. A különböző fotoszintetikus paramétereket a fotoszintetikus folyamatok egyensúlyi, steady-state szintjén határoztuk meg. A vizsgálatok megkezdése előtt a leveleket sötétadaptáltuk. A mérés során a fotoszintézist aktiváló fény intenzitását fokozatosan emeltük 50-1600  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  fényintenzitásig, minden fényintenzitáson elegendő időt hagyva a steady-state egyensúly beállításához (15-20 min). Minden fényintenzitás között 20 perc sötét relaxációs időt hagytunk, amit időnként (60-90 sec) 1 másodperces telítési fényintenzitású flash-kel szakítottunk meg a nem-fotokémiai kioltási komponensek meghatározása érdekében. A  $\text{CO}_2$  fixálás fénytelítési görbéjét adott fényintenzitáson történt 20 perces adaptáció után végeztük el.

A sötétadaptált mintán a korábbi fényintenzitáshoz képest 20 perces sötétadaptálás után mért optimális kvantumhatásfok ( $F_v/F_m$ ) paraméterében nincs szignifikáns különbség a különböző fényintenzitásokon (17.ábra).



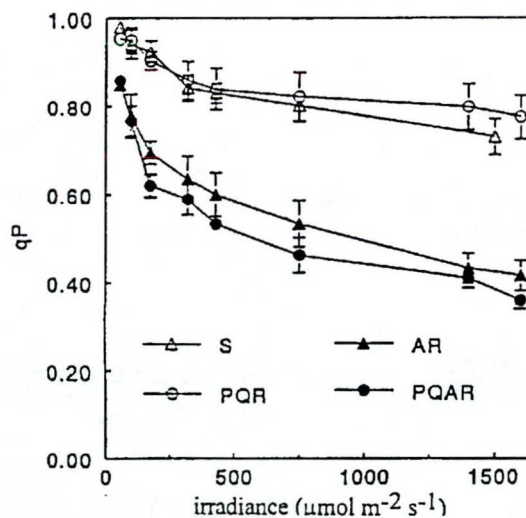
**17.ábra:** A *Conyza canadensis* különböző biotípusainak intakt, le nem vágott leveleken mért PS II optimális kvantumhatásfokának fényintenzitás-függése. Az eredmények 6 független mérés átlagát tartalmazzák.

Ez azt mutatja, hogy a rövid idejű eltérő fényintenzitású fénykezelések nem változtatták meg a növények potenciális fotoszintetizáló képességét olyan nagy mértékben, hogy akár a primer töltésszétválasztás hatékonyságának csökkenésével, akár inaktív PS II reakciócentrumok képződésével kellene számolnunk e rövid idő alatt. Illetve a különböző fényintenzitású kezeléseket követő 20 perces sötétadaptáció elegendő volt a növények fotoszintetikus apparátusának regenerálódásához (17.ábra).



A korábban megállapítottakkal összhangban (III.1.2. fejezet) a fényintenzitás-függésében sem találtunk szignifikáns különbséget az Fv/Fm paraméterben a szenzitív és atrazin-rezisztens biotípusok között, noha e vizsgálatoknál a paraquat-rezisztens növényekben e paraméter egy kicsit magasabbnak adódott. Valószínű azonban, hogy ez nem függ össze a paraquat-rezisztenciával, mivel a paraquat-atrazin-rezisztens biotípusban e különbség már nem mutatkozik meg (17. ábra).

A fotokémiai kioltás tanulmányozásával, a fotokémiai folyamatok hatékonyságára, valamint a PS II plasztokinon pool-ig terjedő akceptor oldali működésére vonhatók le következtetések, ugyanis a fotokémiai kioltás (qP) paramétere szorosan összefüggésbe hozható a Q<sub>A</sub> oxidáltsági/redukáltsági állapotával ill. a PS II reakciócentrumok nyitott vagy zárt állapotával. (Redukált Q<sub>A</sub>, így zárt reakciócentrum mellett nincs lehetőség a fényenergia fotokémiai hasznosulására.) Az Fv/Fm paraméterrel ellentétben a fotokémiai kioltásban (qP) paraméterében jelentős eltérések mutatkoznak mind a fényintenzitás függvényében, mind a biotípusok között. A 18. ábrán jól látható, hogy a fotokémiai kioltás szempontjából a négy biotípus két nagy csoportra osztható. Az atrazin-rezisztens növények (AR, PQAR) fotokémiai kioltása minden fényintenzitáson alacsonyabb, mint az atrazin-rezisztenciával nem rendelkező biotípusoké (S, PQR), jelezve, hogy a redukált Q<sub>A</sub> molekulák mennyisége már alacsony fényintenzitások mellett is szignifikánsan nagyobb ezekben a biotípusokban (18. ábra).

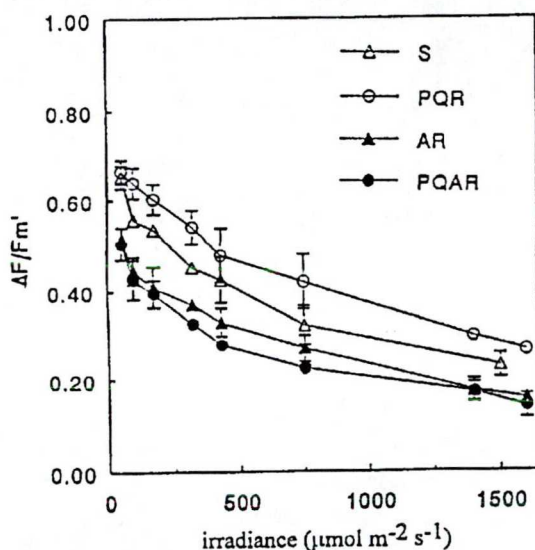


**18. ábra:** A *Conyza canadensis* különböző biotípusainak intakt, le nem vágott leveleken mért fotokémiai kioltási paraméterének (qP) fényintenzitás-függése. Az eredmények 6 független mérés átlagát tartalmazzák.

Azonos idejű sötétadaptálás után, alacsony fényintenzitású megvilágítás esetén ( $AL < 100 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ ) az atrazin-szenzitív (S, PQR) biotípusokban a Q<sub>A</sub> szinte teljesen oxidált



állapotban van, addig az atrazin-rezisztens biotípusok mintegy 15%-a már redukált. Magas fényintenzitáson a két biotípus közti különbség már 40%-nál nagyobb. A redukált  $Q_A$  nagyobb arányának oka a  $Q_B$ -bekötődés affinitáscsökkenése következtében fellépő  $Q_A$ - $Q_B$  közötti csökkent elektrontranszport, amit valószínűleg a  $Q_A$  lassabb reoxidációja idéz elő. Ezt fluoreszcencia lecsengés kinetikai vizsgálatokkal bizonyítottuk (Váradi et al. 1994). A fényintenzitás növekedésével a  $Q_A$  redukáltsági foka nő, a reakciócentrumok fokozatosan bezáródnak és ez a folyamat kifejezettebb az atrazin-rezisztens biotípusok esetében. A zárt reakciócentrumok azonban képtelenek stabil töltésszétválasztást létrehozni, részt venni a lineáris elektrontranszport folyamatokban, így kevesebb gerjesztési energia képes hasznosulni a fotoszintetikus folyamatokban és csökken az egész lineáris elektrontranszport hatékonysága is. Ez megnyilvánul a teljes fotoszintetikus elektrontranszport-lánc hatékonyságával összefüggő effektív kvantumhatásfok ( $\Delta F/F_m'$ ) paraméterében is (19.ábra).

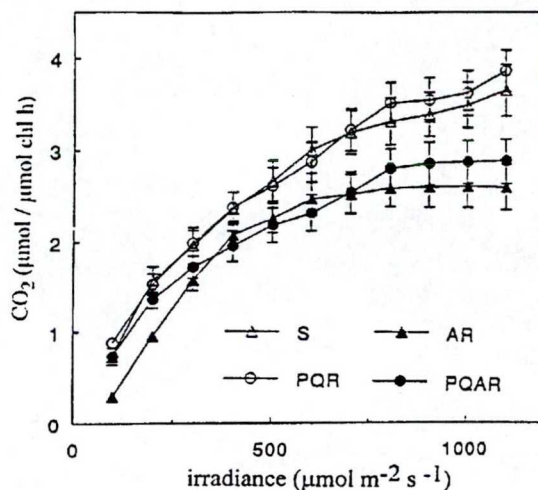


**19.ábra:** A *Conyza canadensis* különböző biotípusainak intakt, le nem vágott leveleken mért effektív kvantumhatásfokának fényintenzitás-függése. Az eredmények 6 független mérés átlagát tartalmazzák.

A  $qP$  paraméterhez hasonlóan az effektív kvantumhatásfok is hasonló fényintenzitás-függő lefutást mutat az atrazin-rezisztens biotípusok esetében. Ugyanakkor ebben a paraméterben az  $F_v/F_m$ -hez hasonlóan ismét visszatér egy enyhe különbség a szenzitív és a paraquat-rezisztens biotípusok között.

Az effektív kvantumhatásfok paraméterével szoros korrelációt mutató  $\text{CO}_2$  fixálásban is megfigyelhető, hogy bármely fényintenzitáson az atrazin-rezisztens növények alacsonyabb  $\text{CO}_2$  fixálási kapacitással rendelkeznek (20.ábra). A betyárkóró különböző biotípusainak  $\text{CO}_2$  fixációjának fénytélítési görbéi azt mutatják, hogy a  $\text{CO}_2$  megkötés quantumhatásfoka (a

fénytelítési görbe kezdeti meredekségéből számolható paraméter) kisebb az atrazin-rezisztens növényekben. Továbbá telítési fényintenzitáson mért CO<sub>2</sub> fixálási ráta lényegesen alacsonyabb (2,7 μmol/μmolchl h) az atrazin-rezisztens biotípusnál, mint az atrazin-szenzitív (3,75 μmol/μmolchl h) növények esetében. Emellett a CO<sub>2</sub> fixálás maximális értékét az atrazin-rezisztens növények már alacsonyabb fényintenzitáson (600-700 μmol/m<sup>2</sup> s ) elérik, míg a szenzitív növények esetében ez csak 900-1000 μmol/m<sup>2</sup> s fényintenzitáson következik be (20.ábra)



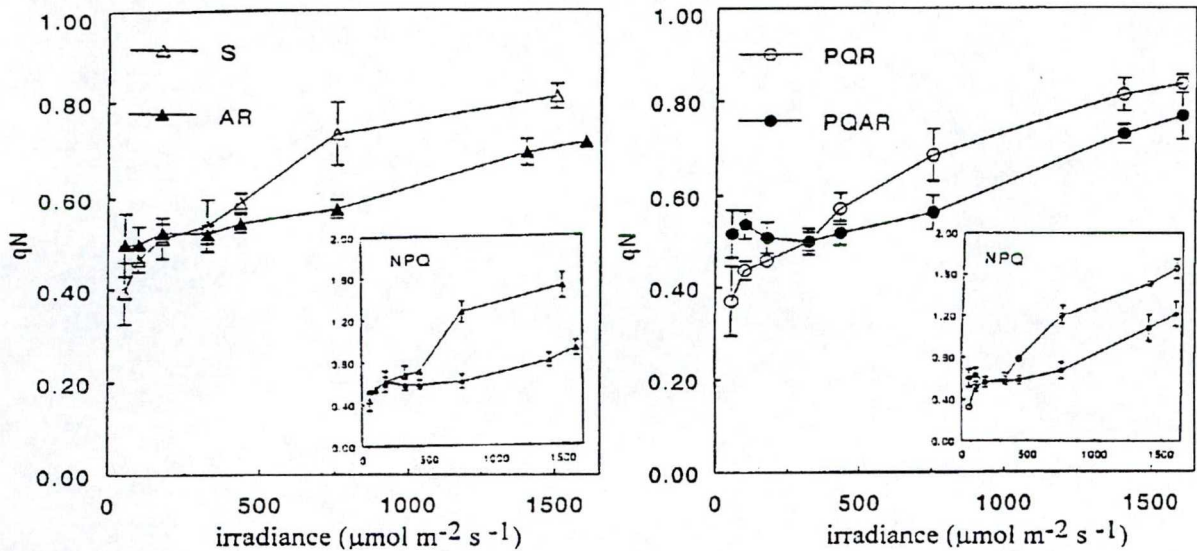
**20.ábra:** A *Conyza canadensis* különböző biotípusainak intakt leveleken mért netto CO<sub>2</sub> fixációs rátája. Az eredmények 4 független mérés átlagát tartalmazzák.

A betyárkóró CO<sub>2</sub> fixálás vizsgálatából levonható következtetések összhangban állnak a korábban vizsgált atrazin-rezisztens és szenzitív biotípusú *Senecio vulgaris* esetében kapott eredményekkel (Holt et al. 1981).

A növények fotoszintetikus aktivitása a fényintenzitás növekedésével a telítési fényintenzitás eléréséig nő, ugyanakkor ezzel párhuzamosan egyre nagyobb mértékben emelkedik az alternatív folyamatok, a fluoreszcencia kisugárzás és a hő formájában történő kisugárzás mértéke is. Az előbbi megfigyelhető a különböző fényintenzitásokon elért steady-state fluoreszcencia szint (Fs) növekedésével, míg az utóbbi az ún. nem-fotokémiai kioltási (qN) paraméterben nyilvánul meg. A különböző biotípusok nem-fotokémiai kioltásának fényintenzitás-függésének tanulmányozása megerősíti a Sundby et al. (1993a) *Brassica napus* és Curwiel et al. (1993) *Chenopodium album* atrazin-rezisztens és szenzitív biotípusain mért eredményeiket, miszerint alacsony fényintenzitáson az atrazin-rezisztens növény nem-fotokémiai kioltási értékei magasabbak, ugyanakkor a magasabb fényintenzitásokon alacsonyabbak, mint a szenzitív növényeké. Ugyanez a következtetés vonható le, a qN



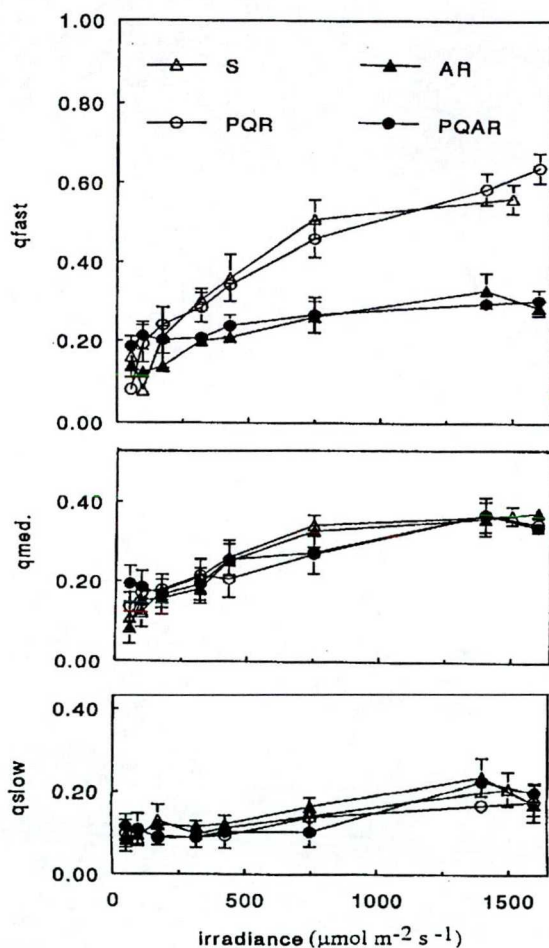
paraméterrel analóg NPQ (sugárzás nélküli energia-disszipáció) paraméterének vizsgálata során is (21.ábra). Ezt a speciális „cross-over” effektust Curwiel et al. (1993) a PS II reakciócentrumához kötött folyamatok ( $\text{Ca}^{2+}$  release, vízbontó rendszer gátlódása) módosulásával értelmezte, míg Sundby et al (1993a) feltételezte, hogy alacsony és magas fényintenzitáson más-más nem-fotokémiai kioltási mechanizmusok játszanak szerepet a nem-fotokémiai kioltási folyamatokban.



**21.ábra:** A *Conyza canadensis* különböző biotípusainak intakt, le nem vágott leveleken mért nem-fotokémiai kioltási paramétereinek ( $q_N$ ) fényintenzitás-függése. A beszűrt ábra a nem-fotokémiai kioltási paraméterrel analóg sugárzás nélküli energia-disszipáció (NPQ) paraméterét ábrázolja. Az eredmények 6 független mérés átlagát tartalmazzák.

Alacsony fényintenzitásokon az atrazin-rezisztens növények zárt reakciócentrumainak nagyobb aránya (alacsonyabb  $q_P$ ) csökkenti annak valószínűségét, hogy az abszorbeált fényenergia fotokémiai úton hasznosulhasson, részt vehessen a lineáris elektrontranszportban, ugyanakkor megnöveli az alternatív folyamatok, így a fluoreszcencia kisugárzás (magasabb  $F_s$ ) és a hő formájában történő energia-kisugárzás valószínűségét is. Ez tükröződik a nagyobb  $q_N$  értékekben. A fényintenzitás növekedésével a növekvő aktivitású lineáris elektrontranszport sebesség megnöveli a pH különbséget a tilakoid-membrán két oldala között, ami aktivál számos olyan folyamatot, ami kedvez a gerjesztési energia termális lecsengésének. Ez jelentős  $q_N$  növekedéshez vezet, ami jól megfigyelhető a szenzitív és paraquat-rezisztens biotípusok esetében. Ugyanakkor az atrazin-rezisztens növények esetében a  $Q_A$  redukáltsági foka a fényintenzitás függvényében intenzívebben nő, ennek ellenére a közepes, vagy magasabb fényintenzitásokon a nem-fotokémiai kioltás paraméterében csak kisebb mértékű növekedés tapasztalható. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy az alacsonyabb fotoszintetikus

elektrontranszport sebesség alacsonyabb  $\Delta pH$ -t hoz létre a tilakoid-membrán két oldala között, így azok a védekező mechanizmusok, amelyek aktiválódásához a  $\Delta pH$  szükséges, kevésbé működnek, mint a szenzitív, vagy paraquat-rezisztens növényekben. Ennek igazolásának egyik lehetséges módja a nem-fotokémiai kioltás ( $qN$ ) egyes komponenseinek részletes analízise. Ismert, hogy a nem-fotokémiai kioltás legalább 3 komponensből tevődik össze, amelyek relaxációs kinetikai időállandójuk alapján szétválaszthatók egy gyors ( $q_{fast}$ ), egy közepes ( $q_{med.}$ ) és egy lassú ( $q_{slow}$ ) komponensre (Horton and Hauge 1988, 1991; Quick and Stitt, 1989). Ezek a komponensek megfelelnek a  $qN$  különböző inhibitorok segítségével azonosított  $qE$ ,  $qT$  és  $qI$  komponenseinek (Krause and Weis 1991). Az 22.ábrán látható, a különböző biotípusok  $qN$  komponenseinek részletes analízise.



**22.ábra:** A nem-fotokémiai kioltás ( $qN$ ) komponenseinek fényintenzitás-függése. A  $q_{fast}$ , a  $qN$  sötét relaxációjának gyors komponense, amely az intratilakoidális pH változással ( $qE$ ) összefüggő folyamatokkal áll kapcsolatban. A  $q_{med.}$ , a nem-fotokémiai kioltás ( $qN$ ) sötét relaxációjának középső komponense, amely a gerjesztési energia újraelosztásával (state átmenetek) ( $qT$ ) kapcsolatos. A  $q_{slow}$ , a nem-fotokémiai kioltás sötét relaxációjának lassan, vagy elég hosszú időn keresztül nem relaxálódó komponense. E paraméter a fotoszintetikus apparátus károsodásával ( $qI$ ) függ össze. Az eredmények 6 független mérés átlagát tartalmazzák.

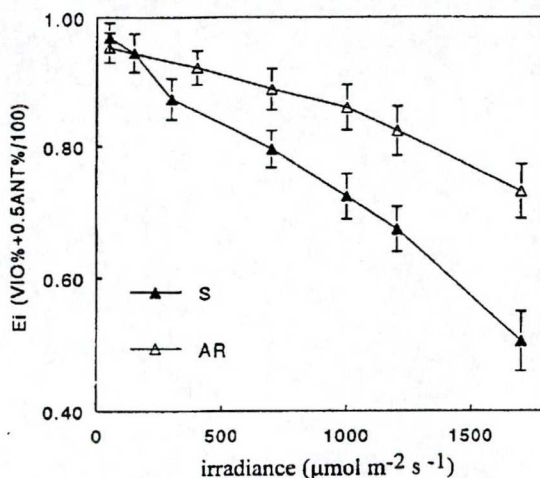


A 3 komponens részarányának fényintenzitás-függéséből látható, hogy 1500-1600  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$  fényintenzitásig terjedő 15 perces megvilágítások főként a gyors komponens részarányának megnövekedését eredményezték, a másik két komponens kismértékű módosulása mellett. A 22. ábrán az is látható, hogy nem található szignifikáns különbség a biotípusok között a két lassabb komponensben, ami arra utal, hogy sem a state átmenetben ( $q_{\text{med}}$ ) sem a fotoszintetikus apparátus irreverzibilis károsodásával összefüggő folyamatokban ( $q_{\text{slow}}$ ) nincs eltérés a biotípusok között. Ez utóbbinak oka lehet, hogy a 15 perces magas fényintenzitású megvilágítás még nem volt elegendő a fotoszintetikus apparátus károsodásához. Ugyanakkor a state átmenettel összefüggő relaxációs kinetikai eredmények jól korrelálnak Ireland Senecio vulgaris-on végzett foszforilációs és különböző hullámhosszú fénykezelésekkel mért state átmeneti vizsgálataival (Ireland et al. 1988). Sem ő sem mi nem észleltünk különbséget a state átmenetben a biotípusok között. Szembetűnő viszont az eltérés a  $q_{\text{N}}$  gyorsan relaxálódó komponensében, ami az intratilkoidális pH változással összefüggő folyamatokkal áll kapcsolatban. Látható, hogy a  $q_{\text{E}}$  magas fényintenzitásokon lényegesen alacsonyabb az atrazin-rezisztens növényekben, mint a szenzitív növények esetében, ami a  $q_{\text{E}}$  quenching mechanizmusok csökkent aktivitására utal. Ez a különbség megmarad akkor is, ha a  $q_{\text{N}}$  3 komponensre való bontása helyett az irodalomban gyakran megfigyelhető 2 komponensre való bontást részesítettük előnybe (van Wijk and van Hasselt 1993), sőt akkor is, ha a  $q_{\text{N}}$  helyett a  $q_{\text{E}}$ -t a Stern-Volmer egyenlet alapján határoztuk meg (Johnson et al. 1993).

A nem-fotokémiai kioltási mechanizmusok egyik igen fontos részét képezi a xantofill ciklus működése. Ennek során a xantofill ciklus komponensei (violaxantin, anteraxantin, zeaxantin) fényintenzitástól, pH-tól, NADPH-tól, aszkorbinsav tartalomtól függően átalakulnak egymásba. Magas fényintenzitáson és alacsony pH-n gyors zeaxantin képződés figyelhető meg, aminek fontos szerepet tulajdonítanak a hő formájában történő energia-kisugárzási folyamatokban. Az atrazin-rezisztens és atrazin-szenzitív biotípusok között a nem-fotokémiai kioltás paraméterében tapasztalható jelentős különbség arra utal, hogy a  $q_{\text{E}}$ -vel összefüggő fotoprotektív folyamatok aktivitása megváltozott az atrazin-rezisztens biotípusokban. HPLC analízis segítségével megvizsgáltuk a violaxantin zeaxantinná történő konverziójának fényintenzitás-függését. A konverzió mértéke többféle formában kifejezhető. Egyik lehetséges módja az epoxidáltsági fokot kifejező epoxidációs index ( $E_i = (\text{Vio}\% + 0.5\text{Ant}\%)/100$ ) (Thayer and Björkman 1990). A 23. ábrán látható, hogy az epoxidációs index a fényintenzitás függvényében csökken a violaxantin de-epoxidációjának megfelelően. Ugyanakkor az is



látható, hogy az atrazin-rezisztens növények esetében ez a csökkenés mérsékeltebb, mint a szenzitív növények esetében jelezve a csökkent mértékű zeaxantin átalakulást.



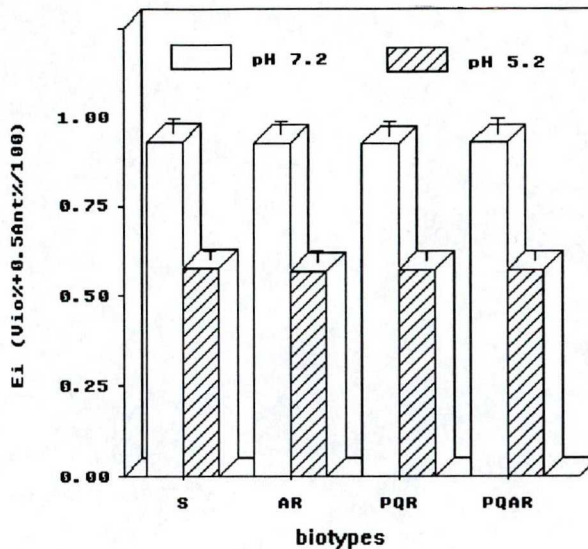
**23.ábra:** Atrazin-rezisztens (AR) és szenzitív *Conyza canadensis* epoxidációs indexének ( $E_i$ ) fényintenzitás-függése. Az eredmények 4 független mérés átlagát tartalmazzák.

Mivel azonban a zeaxantinnek fontos szerepet tulajdonítanak a hő formájában történő energia-kisugárzási folyamatokban, ez magyarázatot adhat a nem-fotokémiai kioltási folyamatok csökkent voltára. Ugyanakkor a folyamat bonyolultságát jelzi, hogy ezek az eredmények még nem döntik el, hogy a lassabb fotoszintetikus elektrontranszport okozta kisebb  $\Delta\text{pH}$  hatására kevésbé aktív de-epoxidáz miatt képződik kevesebb zeaxantin, vagy a de-epoxidáz enzim aktivitásának csökkenése, vagy egyéb az enzimműködéshez szükséges tényező (violaxantin hozzáférhetőségének, aszkorbinsav-tartalom) megváltozása idézte-e elő a csökkent mértékű zeaxantin képződést, ami aztán csökkent mértékű nem-fotokémiai kioltáshoz, zeaxantin-függő qE quenching mechanizmushoz vezet. Mindkét folyamat csökkent mértékű hő formájában történő energia-kisugárzást idéz elő. E kérdés eldönthető pH érzékeny fluoreszcens festékek segítségével mérhető  $\Delta\text{pH}$  méréssel, valamint a violaxantin de-epoxidáz enzim tanulmányozásával.

Ezirányú vizsgálatainkat először a de-epoxidáz enzim tanulmányozásával kezdtük Hager and Holocher (1994) és Bratt et al (1995) vizsgálatai nyomán. A vizsgálatokat előzetesen sötétben tartott és izolált tilakoidokon végeztük kezdetben külső violaxantin hozzáadásával, de az előzetes eredmények alapján úgy tűnt, hogy a preparálás során elegendő mennyiségű violaxantin maradt jelen a tilakoidokban a de-epoxidáz enzim számára, így a későbbiekben ezt a lépést elhanyagoltuk. A violaxantin de-epoxidáz enzim megfelelő működését sötétben, alacsony pH ( $\text{pH}=5,2$ ),  $26^\circ\text{C}$  hőmérséklet és 10 mM aszkorbát jelenlétével biztosítottuk. A kontrol kísérleteket 7,2-s pH-n végeztük. A sötétben lejátszódó reakciót egy óra múlva



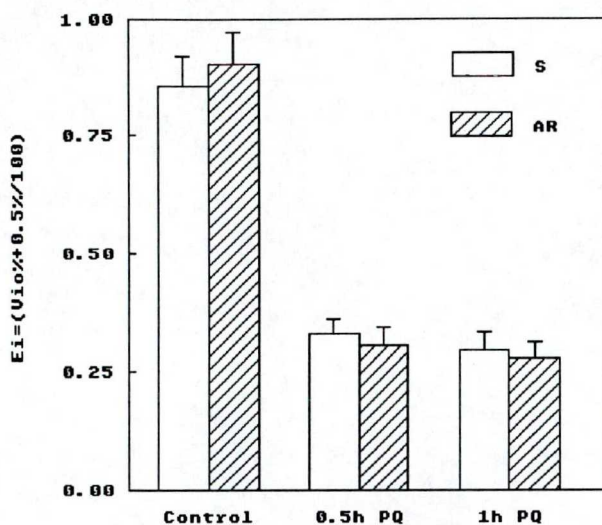
NaHCO<sub>3</sub> hozzáadásával állítottuk le és a pigmenteket NaCl-s kisózással éter segítségével vontuk ki (Hager and Holocher 1994; Bratt et al. 1995). A de-epoxidáz aktivitását az átalakított violaxantin mennyiségével mértük (Ei), amit a korábban ismertetett HPLC-s technika segítségével határoztunk meg.



**24.ábra:** A violaxantin de-epoxidáz enzim *in vitro* aktivitása az epoxidációs index alapján. Az eredmények 3 független kísérlet átlagát tartalmazzák.

A vizsgálatokból kitűnt, hogy megfelelő körülmények biztosítása mellett de-epoxidáz aktivitás detektálható mindegyik biotípus esetében, és hogy nincs szignifikáns különbség az egyes biotípusok mérhető aktivitásában (24.ábra). Ugyanezeket a kísérleteket elvégeztük *Chenopodium album* és *Solanum nigrum* atrazin rezisztens és szenzitív biotípusain is, hasonló eredményt kapva (nincs de-epoxidáz enzimaktivitás különbség a biotípusok között *in vitro*, izolált rendszerekben). Bár a kísérleteinket *in vitro* végeztük, ezek a vizsgálatok arra utalnak, hogy a de-epoxidáz enzim megfelelő aktivitással működik optimális körülmények között, azaz a csökkent de-epoxidáz aktivitás oka nem egy esetleges enzimkárosodás következménye. Azok alapján, hogy a vizsgálataink során nem volt szükség külső violaxantin hozzáadására feltételezhető, hogy elegendő mennyiségű violaxantin áll rendelkezésre mindegyik biotípus esetében a de-epoxidáz működésére. A de-epoxidáz működéséhez elengedhetetlenül szükséges megfelelő mennyiségű aszkorbát jelenléte. Ezt bizonyítja az is, hogy alacsony pH-n de aszkorbinsav jelenléte nélkül violaxantin átalakulás nem volt detektálható (kontrol kísérlet, az eredmény külön nem mutatom be). Irodalmi adatok szerint, az aszkorbinsav koncentrációja a kloroplasztiszban 10-25mM között van (Foyer et al. 1989; Schöner and Krause 1990; Pfündel and Bilger 1994), így természetes körülmények között ez nem limitálja az enzimátikus folyamatoknak. További bizonyítékot szolgáltat az atrazin-rezisztens növényekben

funkcionálisan ép de-epoxidáz enzim jelenlétére, hogy paraquat kezelés hatására erőteljes violaxantin→zeaxantin átalakulása figyelhető meg mind a szenzitív, mind az atrazin-rezisztens biotípus esetében (25.ábra).



**25.ábra:** Atrazin-rezisztens és szenzitív *Conyza canadensis* epoxidációs indexének ( $E_i$ ) változása alacsony fényintenzitáson történt ( $200\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) paraquat ( $0.5\text{mM}$ ) kezelés hatására.

A paraquat, elektrontranszport stimuláló tulajdonságának köszönhetően a lumen savasodását idézi elő, ami megnöveli mind az energia-függő kioltási folyamatok, mind a de-epoxidáz enzim aktivitását (Thiele and Krause 1994). A paraquat kezelés hatására az atrazin-rezisztens és szenzitív növényekben megfigyelhető azonos epoxidációs index ( $E_i$ ) csökkenés (enzimaktivitás növekedés) egyben azt is jelzi, hogy külső elektrontranszport stimulálók hatására a fotoszintetikus elektrontranszport aktivitása képes megnőni az atrazin-rezisztens növényekben is. Mindezen kísérletek alapján feltételezhető, hogy az atrazin-rezisztens növények in vivo de-epoxidáz aktivitásának csökkenésének nem az enzim mutációja, vagy a hozzáférhető violaxantin mennyiségének lecsökkenése a felelős, hanem a fotoszintetikus elektrontranszport-lánc lassabb működése következtében kialakuló kisebb intratilakoidális pH különbség.

A betyárkóró fényérzékenységének vizsgálata alapján megállapítható, hogy az atrazin-rezisztens növényekben tapasztalható D1 protein mutáció következményeként fellépő csökkent fotoszintetikus elektrontranszport következtében csökken az abszorbeált fényenergia fotokémiai úton történő hasznosulásának mértéke. Ugyanakkor a csökkent mértékű zeaxantin képződés miatt csökken a hő formájában történő energia-kisugárzás fotoprotektív folyamatainak védő szerepe is. A fluoreszcencia sugárzás megemelkedése nem képes eliminálni



a fotoszintetikus apparátus pigmentjei által elnyelt gerjesztési energiát, így a különböző gerjesztett állapotú pigmentek nagyobb valószínűséggel hoznak létre toxikus gyököket növelve ezzel a fotoszintetikus apparátus fényérzékenységét és hosszútávon a magas fényintenzitás okozta fénygátlással szembeni csökkent toleranciáját (Darkó et al. 1996).

A paraquat-rezisztens növények fényérzékenységi vizsgálata azt mutatja, hogy kismértékű különbség tapasztalható az optimális és effektív kvantumhatásfok paramétereiben, ugyanakkor nem tapasztalható különbség a fotokémiai és nem-fotokémiai kioltás paramétereiben, ami arra utal, hogy a paraquat-rezisztenciának nincs számottevő hatása a fotoszintetikus elektrontranszport folyamatokra és a nem-fotokémiai kioltásban megnyilvánuló fotoprotektív mechanizmusokra. Az a tény, hogy a paraquat-rezisztencia hatásai nem mutatkoznak meg a paraquat-atrazin-rezisztens növényekben megerősíti azt a feltételezést, hogy az általam vizsgált herbicid-rezisztens növények fényérzékenységét a psbA gén mutációja és pleiotropikus hatásai határozzák meg (Darkó et al. 1996).

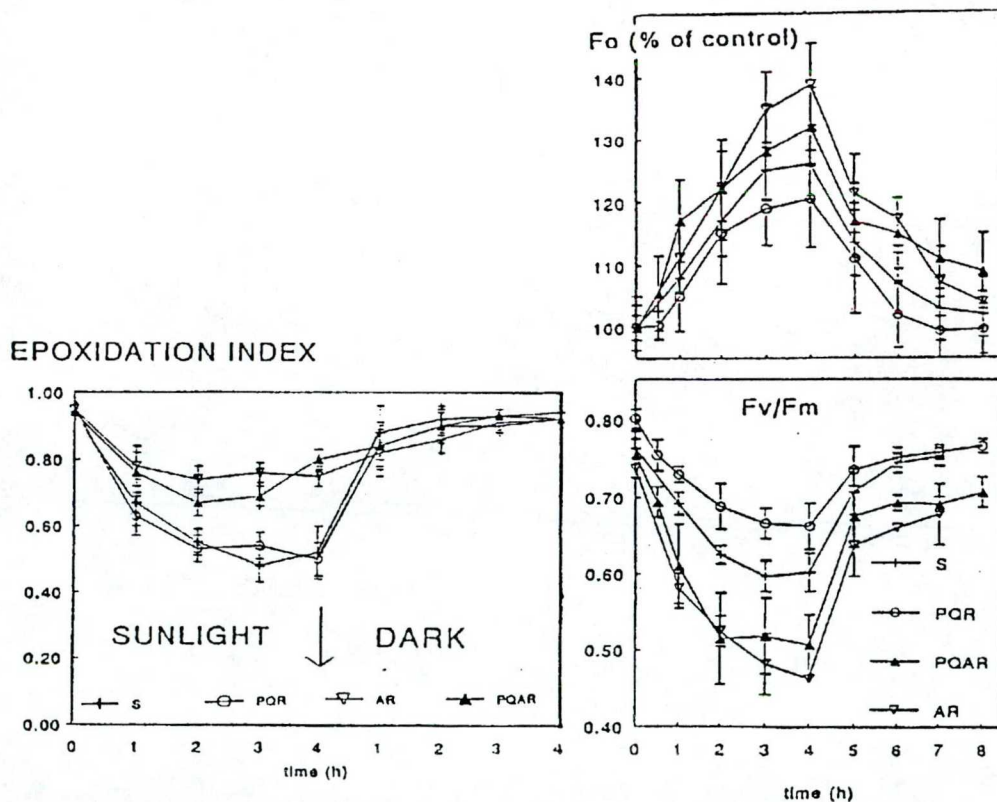
### **III.2.2 Herbicid-rezisztens növények fénygátlása**

Mint említettem a fény-függő fotoszintetikus folyamatok másik lehetséges vizsgálati módja, hogy hosszú idejű magas fényintenzitású kezelések hatását vizsgáljuk. Ebben az esetben a magas fényintenzitás okozta kioltási folyamatok mellett számolni kell a fotoszintetikus apparátus károsodásával is. A magas fényintenzitás okozta károsító hatások egyik fő hatóhelye a PS II core-komplex (Barber and Andersson 1992). A PS II akceptor vagy donor oldali károsodása következtében a PS II reakciócentrum inaktíválódik, a továbbiakban nem képes részt venni a fotoszintetikus folyamatokban és ez fotoszintetikus aktivitáscsökkenéshez vezet. E folyamatok összessége nyilvánul a fluoreszcencia indukciós paraméterekben is. A PS II károsodása miatt az LHC II-k nem képesek átadni a gerjesztési energiájukat a reakciócentrumoknak, leválnak a core-ról és ez a „szabad” pigmenttartalom relatív megnövekedéséhez vezet. Ez az  $F_0$  fluoreszcencia szint emelkedését eredményezi. Ugyanakkor az inaktív reakciócentrumok a  $P_{680}$ , illetve a donor vagy akceptor oldal hiánya miatt nem képesek primer töltésszétválasztást létrehozni, nem vesznek részt a lineáris elektrontranszportban. Ez a változó fluoreszcencia ( $F_v$ ) szint csökkenéséhez járul hozzá. A két folyamat eredményeként az  $F_v/F_m$  is csökken. A magas fényintenzitás okozta károsító hatások megszűnése után, alacsonyabb fényintenzitáson a fotoszintetikus folyamatok idővel visszanyerik eredeti aktivitásukat, ami részben a kioltó mechanizmusok arányának csökkenésének, részben a repair folyamatok során az új, vagy javított D1 protein

reakciócentrumba történő beépülésének és aktiválódásának köszönhető (Aro et al. 1993). A fénygátlást követő „recovery” folyamatok időbeli lefutásuk szerint két csoportba sorolhatók (Leitsch et al. 1994). A fénygátlást követően a fotoszintetikus apparátus viszonylag gyorsan visszanyeri fotoszintetikus aktivitásának jelentős részét (80%). Ebben a szakaszban fontos szerepe van a xantofill ciklus pigmentek visszaalakulásának is, míg későbbiekben a D1 protein károsodásával és újrászintetizálásával kapcsolatos folyamatok dominálnak.

A betyárkóró különböző biotípusainak magas fényintenzitású kezelésre adott válaszreakcióinak hatását 4h 1500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  s fényintenzitású fényen történt kezelés után fluoreszcencia indukció módszerével vizsgáltuk. Ezt követően a növényeket alacsony fényintenzitásra (150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  s) helyezve a regenerálódás folyamatait tanulmányoztuk. Emellett a xantofill ciklus pigmentek átalakulását is nyomon követtük.

A 26. ábrán látható, hogy a hosszantartó fénykezelések a xantofill ciklus aktivitásának beindulása mellett a PS II reakciócentrumok inaktiválódásához is vezetett, ami megnyilvánul az  $F_o$  paraméter megnövekedésében, valamint az optimális kvantumhatásfok ( $F_v/F_m$ ) jelentős mértékű csökkenésében.



**26.ábra:**  $F_o$ ,  $F_v/F_m$  fluoreszcencia indukciós paraméterek, valamint az epoxidációs index ( $E_i$ ) változása 4h magas ( $1500\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) fényintenzitású kezelés és az azt követő relaxációs folyamatok hatására.



A biotípusok összehasonlítása során megállapítható, hogy a tartósan magas fényintenzitású kezelések az atrazin-rezisztens növényekben jelentősebb  $F_o$  szint növekedést és  $F_v/F_m$  szint csökkenést eredményezett, mint az atrazin-rezisztenciával nem rendelkező növényekben, jelezve a PS II reakciócentrumok nagyobb mértékű károsodását, inaktiválódását. Ugyanakkor a fotoprotektív xantofill ciklus csökkent mértékű működése is megfigyelhető, ami jelentős mértékben hozzájárulhat a PS II nagyobb mértékű inaktiválódásához (Váradi et al. 1995).

Érdekes módon a fényérzékenységi vizsgálatokhoz hasonlóan a paraquat-rezisztens növények itt is magasabb  $F_v/F_m$  paramétert mutattak (Váradi et al. 1995).

A magas fényintenzitású kezelések megszűnése után a regenerálódási szakaszban az  $F_v/F_m$  paraméterben jelentős növekedés tapasztalható mindegyik biotípus esetében és kb. négy óra múlva visszaáll az eredeti szintre. Ez a regenerálódási folyamat azonban bifázikus, egy órán belül mintegy 80%-os  $F_v/F_m$  növekedés figyelhető meg. A későbbiekben már csak lassú növekedés tapasztalható. Az epoxidációs index vizsgálata során az is kiderül, hogy működő xantofill ciklus esetében (atrazin-szenzitív növények) a zeaxantinnak violaxantinná történő visszaalakulása az alacsony fényintenzitású kezeléseket követő 1 órán belül lezajlik. Ez csökkenti a fénygátlás alatt meglévő Fm kioltást és hozzájárul az  $F_v/F_m$  növekedéséhez (Váradi et al. 1995).

Az atrazin-rezisztens növények esetében a nagyobb mértékű  $F_v/F_m$  csökkenés után kifejezettebb az  $F_v/F_m$  növekedés, ami magyarázható az atrazin-rezisztens növényekben megfigyelt gyorsabb D1 protein turnoverval (Sundby et al. 1993b).

Mind a fénygátlás, mind a recovery folyamata komplex, mivel egyszerre van jelen a magas fényintenzitás okozta xantofill ciklus aktiválódása és a D1 protein inaktiválódása. E két folyamat mindegyike változó fluoreszcencia kioltáshoz vezet, ugyanakkor egymással ellentétes folyamatok is, mivel a jól működő xantofill ciklus lehetővé teszi a gerjesztési energia hő formájában történő elvezetését, csökkentve ezzel a gerjesztési energia károsító hatásainak mértékét.

### **III.2.3 A fénygátlás folyamatainak tanulmányozása**

A magas fényintenzitás okozta károsító hatások kivédésére a növények számos stratégiát dolgoztak ki. Az egyik lehetőség, hogy növeli a gerjesztési energia alternatív úton (hő formájában) történő kisugárzásnak mennyiségét, másik, hogy a károsodott reakciócentrumokat kijavítja. A fénygátlás jelensége során mindkét „stratégia” jelen van. Régóta vitatott és a mai

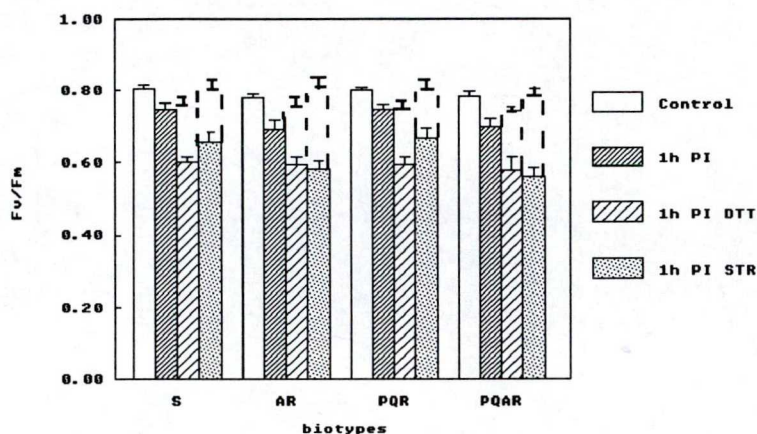


napig nem eldöntött kérdés e folyamatok *in vivo* részesevé a fénygátlás mechanizmusában. A kérdés az egyes folyamatok inaktiválásával, eliminálásával tanulmányozható. A repair folyamatok esetében a sérült reakciócentrumok (D1 protein) *de novo* fehérjeszintézis révén javítódnak ki, így a folyamat kloroplasztisz kódolt fehérjeszintézis-gátlókkal (streptomycin, kloramfenikol, lincomycin) megakadályozható (Guenther and Melis 1990; Melis 1991; Aro et al. 1993). A hő formájában történő energia-kisugárzás folyamatai igen bonyolultak, így annak gátlása sem egyértelmű. A xantofill ciklus gátlásával (DTT) ezen folyamatok legalább részben gátolhatók (Winter and Königer 1989; Demmig-Adams et al 1990; Demmig-Adams and Adams 1992). Mivel a fénygátlás folyamatai jól tanulmányozhatók a funkcionálisan aktív PS II reakciócentrumok inaktivációjának mértékével (Fv/Fm csökkenés) számos szerző ezen inhibitorok hatását a fénygátolt növényekhez képesti Fv/Fm csökkenés mértékével jellemzi (Tyystjärvi et al. 1992; Rintamäki et al. 1994; Park et al. 1995). Gyakran azonban a különböző inhibitorok nem ugyanolyan ideig aktívak a növényben, így egy-egy inhibitor hosszantartó vizsgálata számos problémát vet fel. Általában elmondható, hogy a fehérjeszintézis-gátlók tartós hatást képesek kifejteni (több, mint 24h) ugyanakkor a DTT gátlása csak pár óráig hatásos bizonyosan. Így egy esetleges 4h fénykezelés és azt követő 4-24h recovery számos pontatlanságra és téves értelmezésre adhat okot.

E probléma elkerülésére a különböző folyamatokra ható inhibitorok magas fényintenzitású kezelésekre gyakorolt hatását 1h 1200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  s fényintenzitású fénytel történt kezeléssel tanulmányoztuk az eddig is vizsgált betyárkóró biotípusokon. Az inhibitorokat a fénykezelés megkezdése előtt 1-2 órával permetezéssel jutattuk a levelek felületére, majd alacsony fényintenzitáson (100-150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  s) tartottuk a gátló hatás eléréseig. Ezután alkalmaztunk a magas fényintenzitású kezelést és fluoreszcencia quenching analízis segítségével detektáltuk a hatást. Míg az előző fejezetben az Fv/Fm-t sötétadaptálás után detektáljuk (bármilyen fényforrás alkalmazható a fénykezelésre), addig a quenching paraméterek meghatározása magas fényintenzitású aktinikus fény segítségével történik. Noha a vizsgálatokat célszerűbb lett volna hosszabb ideig végezni a nagyobb hatás elérése érdekében, erre technikai okok miatt nem volt lehetőségünk. Így a különböző inhibitorok, azaz a különböző részfolyamatok magas fényintenzitású kezelésre adott hatásainak tanulmányozása többé-kevésbé megfelel az előző fejezetben bemutatott 1h-s kezelésnek megfelelő állapotnak. Mivel már 1h múlva is jelentős eltérés tapasztalható az egyes biotípusok között, feltételezhetően ezen kísérleti körülmények között is detektálhatók a különböző hatások.



Az 1h magas fényintenzitású ( $1200 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ ) kezelések hasonló hatást váltottak ki az optimális kvantumhatásfok paraméterére, mint az a 26 ábrán is látható, azaz a szenzitív biotípusok esetében kisebb mértékű Fv/Fm csökkenés detektálható, mint az atrazin-rezisztens biotípusok esetében, noha ezek az értékek még nem jeleznek drasztikus károsodást (27.ábra). A 20mM 1h alacsony fényintenzitáson ( $100\text{-}150 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ ) történt DTT előkezelés a kontrollhoz képest kismértékben csökkentette az aktív PS II reakciócentrumok számát minden biotípus esetében ugyanolyan mértékben (27.ábra, szaggatott vonal).

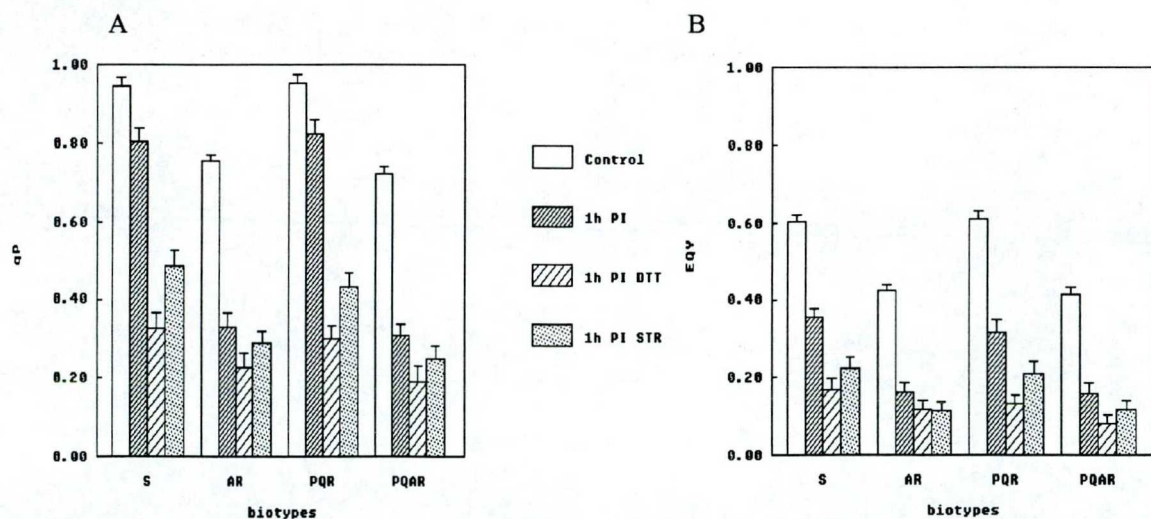


**27.ábra:** Különböző gátlószerek és az 1h  $1200 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  fényintenzitású kezelés hatása az optimális kvantumhatásfok (Fv/Fm) paraméterére. Az ábra 4 mérés átlagát tartalmazza.

A DTT kezelést követően a magas fényintenzitás jelentős PS II aktivitáscsökkenést idézett elő különösen a szenzitív növényeknél. A DTT kezelés hatásának drasztikusabb megnyilvánulása atrazin-szenzitív növényekben összhangban áll a korábbi megfigyelésekkel, miszerint a magas fényintenzitáson a szenzitív növényben a xantofill ciklus aktivitása szignifikánsan nagyobb, mint a rezisztens növényekben (Darkó et al, 1996). Érdekes megfigyelés, hogy a DTT és a magas fényintenzitás együttes hatásának eredményeképpen többé-kevésbé ugyanakkora Fv/Fm paraméter detektálható (a kontrollhoz képest mintegy 0,2 egységgel csökkent az Fv/Fm) minden biotípus esetében. Azonban a fénygátlás valamint a xantofill ciklus inaktivációja okozta Fv/Fm csökkenés részesedése eltér az atrazin-rezisztens és atrazin-szenzitív biotípusok között. A magas fényintenzitás 0,05 Fv/Fm csökkenést eredményezett, a DTT kezelés további 0,15 Fv/Fm csökkenést idézett elő a szenzitív biotípusok esetében, ugyanakkor 0,1-s Fv/Fm csökkenés tapasztalható csak fénykezelésre és ugyanekkora mértékű (0,1) a csökkenés a DTT kezelésre az atrazin-rezisztens biotípusoknál. Az értékek kompetitív jellege arra utal, hogy a PS II inaktivációjában a xantofill ciklusnak fontos szerepe van.

Alacsony fényintenzitáson a 2h, 1mM-os szterptomycin (STR) előkezelés nem változtatta meg az Fv/Fm paraméter értékeit (27.ábra). Feltételezhető, hogy ezen a fényintenzitáson sem a károsodás, sem a repair folyamatok mértéke nem jelentős. A magas fényintenzitású szterptomycin kezelés a DTT kezeléshez hasonlóan jelentős Fv/Fm csökkenést idézett elő különösen az atrazin-rezisztens növényekben. A szenzitív növények esetében azonban a DTT kezelt mintáknál kisebb mértékű Fv/Fm változás volt detektálható. Ez részben annak tulajdonítható, hogy a magas fényintenzitású kezelések eleve kisebb károsodást idéznek elő a szenzitív növényekben, mint a D1 protein mutációval rendelkező atrazin-rezisztens növényekben, így a D1 protein repair folyamatok jelentősége kisebb ezeknél a biotípusoknál. Ezzel szemben az atrazin-rezisztens növényeknél a nagyobb fénygátlás, vagy az eleve jelentősebb repair folyamatok (Sundby et al. 1993b) következtében a sztreptomycin kezelés jelentősebb Fv/Fm csökkenést idézett elő. Ez arra is utalhat, hogy a különböző fotoprotektív folyamatok részesedése az egyes biotípusok esetében más és más lehet.

Mind a fotokémiai kioltás (qP), mind az effektív kvantumhatásfok (röviden EQY) paraméterében drasztikus változást idézett elő a magas fényintenzitás és a különböző inhibitorok együttes hatása. A kontroll és a csak fénygátolt mintákon megfigyelhetők mindazok a különbségek, amelyek az atrazin-rezisztens növényekre jellemzőek alacsony és magas fényintenzitásokon, nevezetesen az atrazin-rezisztens növények alacsonyabb qP és kisebb EQY értékei (28.ábra). Ezeket az értékeket a különböző gátlószerek tovább csökkentették, jelezve a redukált  $Q_A$  arányának megnövekedését, ill. a fotoszintetikus elektrontranszport hatékonyságának csökkenését (28.ábra).



**28.ábra:** Különböző gátlószerek és az 1h 1200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  fényintenzitású kezelés hatása a fotokémiai (qP) (A.) kioltás és az effektív kvantumhatásfok (EQY) (B.) paraméterére.



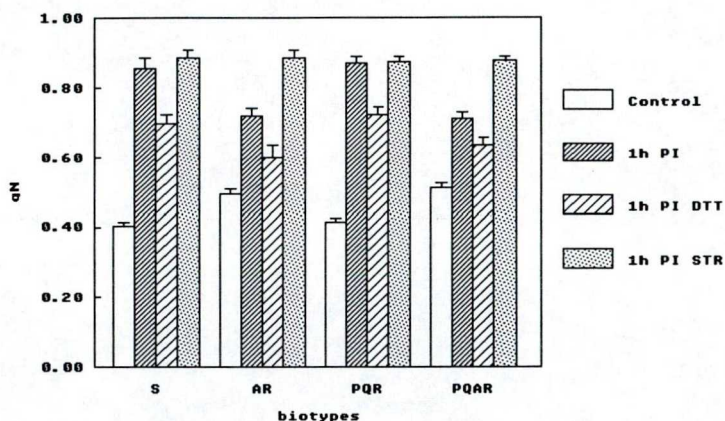
A DTT-nek direkt fotokémiai folyamatokra gyakorolt hatása csak kis valószínűségű (Pfündel and Bilger 1994), így feltételezhető, hogy a DTT fotoszintetikus elektrontranszport folyamatokra gyakorolt indirekt hatása abból ered, hogy gátolva a xantofill ciklus működését (csökkentve a hő formájában történő energia-kisugárzás lehetőségét) a gerjesztési energia nagyobb hányada jut el a reakciócentrumokig, aminek következtében megnő a redukált  $Q_A$ -k aránya, csökken a  $qP$ . Ezt mutatja az is, hogy a DTT kezelés különösen jelentős csökkenést az atrazin-szenzitív biotípusok esetében idézett elő, ahol magas fényintenzitáson a xantofill ciklus működése kifejezettebb, mint a rezisztens növényekben (28.ábra). Továbbá jelzi, hogy a xantofill ciklus működésének eliminálása jelentős fotoszintetikus aktivitáscsökkenést idéz elő, így szerepe a magas fényintenzitású károsító folyamatok kivédésében rendkívül fontos a szenzitív növények esetében.

Az atrazin-rezisztens növényekben a magas fényintenzitás önmagában is drasztikus  $qP$  csökkenést idézett elő, (a korábban megfigyelt eredményekhez hasonlóan), amit a DTT már csak kismértékben csökkentett (28.ábra). Ennek oka lehet, hogy az amúgy is gyengén működő xantofill ciklus további inaktiválása már csak kismértékben járul hozzá a  $qP$  csökkenéséhez. A DTT kezelés a szenzitív növényekben hasonló hatást váltott ki a fotokémiai ( $qP$ ),  $EQY$  és a nem-fotokémiai ( $qN$ ) folyamatokra, valamint a fluoreszcencia kisugárzás steady-state szintjére ( $F_s$ ) (megnő), mint a csak magas fényintenzitású kezelések (DTT nélkül) az atrazin-rezisztens növényekben. Ez azt sugallja, hogy az atrazin-rezisztens növények magas fényintenzitás okozta fotoszintetikus aktivitáscsökkenését nagyban meghatározza a xantofill ciklus kis hatásfokú működése.

A fehérjeszintézis-gátlószerek vizsgálata során Schnettger és mtsai által (1994) kimutatható volt egyes gátlószerek (kloramfenikol) direkt fotoszintetikus elektrontranszportra gyakorolt hatása, de ez a sztreptomycin esetében jóval kisebb mértékűnek bizonyult, noha kismértékű  $qP$  csökkenést ott is megfigyeltek (Greer et al. 1993; Schnettger et. al 1994). Az általunk vizsgált *Conyza canadensis* esetében a sztreptomycin jelentős  $qP$  és  $EQY$  csökkenést idézett elő, bár ennek mértéke nem érte el a DTT kezelését (28.ábra). Mivel azonban a sztreptomycin más fiziológiai folyamatokat vált ki, mint a DTT, a  $qP$  csökkenés háttérében nem szükségszerűen állnak ugyanazok a folyamatok. Ezt bizonyítja az is, hogy a két inhibitornak a nem-fotokémiai kioltási ( $qN$ ) folyamatokra gyakorolt hatása jelentősen eltér egymástól. Míg a DTT kezelés csökkentette a nem-fotokémiai kioltás ( $qN$ ) paraméterét, addig a sztreptomycin növelte azt (29.ábra). Ez abból eredhet, hogy a sztreptomycin kezelés hatására a gátolt repair folyamatok miatt megnövekedett az inaktív PS II reakciócentrumok száma. Ezek azonban feltételezhetően



a tilakoid-membrán gránum régiójában maradványok továbbra is részt vesznek a gerjesztési energia hő formájában történő kisugárzásában, védve ezáltal a még aktív PS II reakciócentrumokat a további károsodásoktól (Krause 1988; Smith et al. 1990; Öquist et al. 1992). A DTT kezelés viszont az irodalmi adatoknak megfelelően csökkentette a nem-fotokémiai kioltás ( $q_N$ ) mértékét (Demmig-Adams et al. 1990) (29.ábra).



29.ábra: Különböző gátlószerek és az 1h 1200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  fényintenzitású kezelés hatása a nem-fotokémiai kioltás ( $q_N$ ) paraméterére. Az ábra 4 mérés átlagát tartalmazza.

Sztreptomycin kezelés hatására a szenzitív növényekben a  $q_N$  csak kismértékben növekedett meg az 1h 1200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  fényintenzitású kezeléshez képest, míg a növekedés az atrazin-rezisztens növények esetében kifejezett. Ez összhangban áll az atrazin-rezisztens növényekben a magas fényintenzitás hatására megfigyelhető nagyobb  $F_v/F_m$  csökkenéssel, ami feltételezi, hogy a károsodott reakciócentrumok száma is jelentősebb mértékben nőtt meg, mint a szenzitív növények esetében.

Ezek a vizsgálatok egyértelműen jelzik és megerősítik a korábban megfigyelt jelenségeket, miszerint a szenzitív növényekben a xantofill ciklus fotoprotektív szerepe jelentős mértékben hozzájárul a magas fényintenzitás okozta károsító hatások kivédéséhez. Ezt bizonyítja az is, hogy elsősorban az atrazin-szenzitív növények fotoszintetikus paraméterei változtak drasztikusan DTT kezelés hatására. Ugyanakkor a repair folyamatok is különbözhetnek a két biotípus között, amit viszont a sztreptomycin kezelésre adott eltérő érzékenység jelez. Mindezek arra utalnak, hogy a magas fényintenzitás okozta károsító hatások kivédésére kialakult mechanizmusok részesedése és jelentősége eltérhet a biotípusok között. Az atrazin-rezisztens növények nagyobb fényérzékenysége azt is jelzi, hogy a xantofill ciklus fotoprotektív szerepének hiánya nem ellensúlyozható más folyamatokkal.



### III.3 Paraquat fitotoxikus hatásának tanulmányozása a betyárkóró különböző herbicid-rezisztens biotípusain

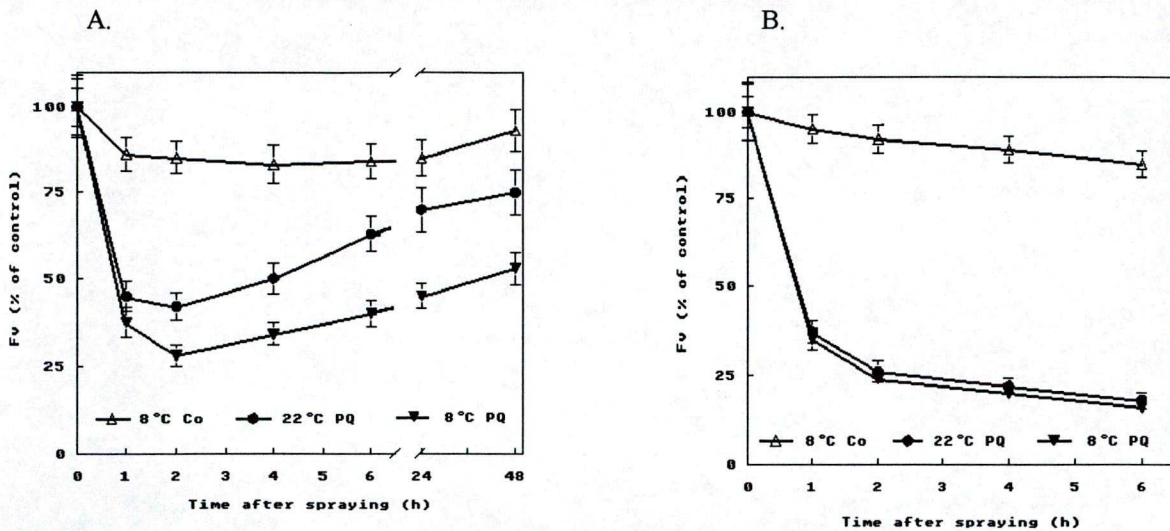
A paraquat fotoszintetizáló szövetekre gyakorolt fitotoxikus hatását két tényező határozza meg. Egyrészt a PS I akceptor oldalához kapcsolódva az elektronokat a természetes fotoszintetikus elektrontranszport úttól eltéríti megakadályozva ezzel elegendő mennyiségű NADPH képződését. Mindezt olyan gyorsan teszi, hogy szinte elszívja az elektronokat a fotoszintetikus elektrontranszport-lánctól. (Ezért kis koncentrációban gyakran használják PS I akceptorként, elektrontranszport stimulátorként (Thiele and Krause 1994)). Másrészt viszont működése következtében generál számos toxikus oxigéngyököt, amelyek aztán szinte láncreakciószerűen további toxikus oxigén- és lipidperoxid-gyököket hoznak létre, károsítva ezzel a fotoszintetikus apparátus működését és szerkezetét. Így a paraquat oxidatív károsodást idéz elő a növényekben, más stresszhatások (mint pl. fénygátlás, ózon) okozta károsodásokhoz hasonlóan. A jelentős mértékben károsodott fotoszintetikus apparátus további működésre képtelenné válik, a fotoszintetikus folyamatok gátlódnak, végül az egész növény elpusztul. A paraquat elsődleges (elektrontranszportra gyakorolt) és másodlagos (toxikus oxigén-gyök képző) fitotoxikus tulajdonsága részben egymással ellentétes, ugyanakkor egymástól nehezen szétválaszthatóak.

A paraquat fitotoxikus hatását az általam is vizsgált betyárkóró szenzitív és paraquat-atrazin-rezisztens biotípusain Lehoczki és mtsai korábban is tanulmányozták. Vizsgálataik alapján megállapítható volt, hogy paraquat kezelés hatására a CO<sub>2</sub> fixálás, az O<sub>2</sub> fejlődés jelentős mértékben csökkent mindkét biotípus esetében a kezelést követő 1-2 órán belül. Ez a csökkenés tovább folytatódott a szenzitív növény esetében és 4-6h múlva a növény elpusztult. A rezisztens biotípus esetében 4h múlva a CO<sub>2</sub> fixálás és az O<sub>2</sub> kiválasztás újra emelkedésnek indult, és 24h múlva jelentős javulás volt detektálható (Lehoczki et al. 1992). Hasonló jelenséget figyeltek meg a változó fluoreszcencia intenzitásának alakulásában. Kimutatták, hogy az Fv csökkenése függött a kezelés során alkalmazott fényintenzitástól. A fényintenzitás növekedésével a paraquat egyre nagyobb mértékben fejtette ki károsító hatását, de befolyásolta a rezisztens növények regenerálódási folyamatait is (Lehoczki et al. 1992).

A hőmérséklet elsősorban a paraquat-rezisztens növények regenerálódási folyamatait befolyásolta, míg kevésbé volt hatással a szenzitív növényekre ill. a változó fluoreszcencia csökkenés mértékére (30. ábra). Alacsony hőmérsékleten (8°C) azonban a regenerálódás lelassult a paraquat-rezisztens növényekben, ami megerősíti azt a feltételezést, hogy a



regenerálódási szakasz paraquat hatására indukálódó metabolikus eredetű folyamatokkal áll kapcsolatban (30.ábra) (Szigeti et al. 1996; Lasztity et al. 1998).



**30.ábra:** Hőmérséklet hatása a paraquat kezelt paraquat-atrazin-rezisztens (A) és szenzitív (B) betyárkóró változó fluoreszcencia (Fv) intenzitására.

Ezeket a vizsgálatokat a paraquat/atrazin-rezisztens növényeken végeztük, majd később hasonló eredményeket detektálhattunk csak paraquat-rezisztens növényeken is.

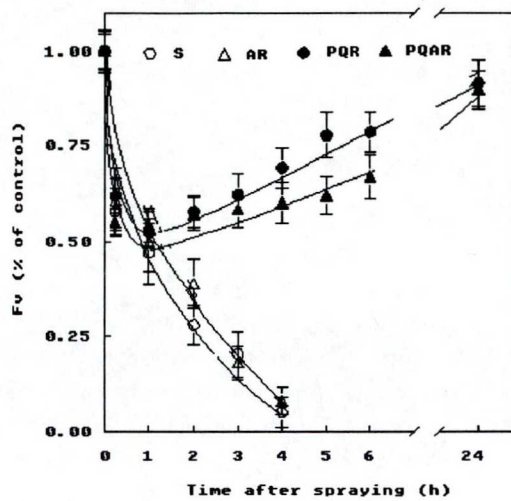
### III.3. 1 Paraquat hatása a fotoszintetikus elektrontranszport-lánc működésére

#### A. Fluoreszcencia indukció és quenching analízis vizsgálata

A különböző herbicid-rezisztens növények paraquat permetezésre adott sötétadaptálás után mért fluoreszcencia kisugárzás intenzitása hasonló lefutást mutatott, mint a korábban megfigyelt szenzitív és PQAR biotípusoknál, azaz gyors és irreverzibilis volt a paraquat-szenzitív biotípusok (S, AR) esetében, míg kisebb mértékű és átmeneti a paraquat-rezisztenciával rendelkező biotípusok (PQR, PAQR) esetében. Ez különösen megfigyelhető volt a maximális (Fm) fluoreszcencia intenzitásának csökkenésében, ami elsősorban a maximális fluoreszcencia változó komponensének (Fv) részaránya miatti csökkenésből ered (31.ábra). Ennek oka kettős lehet. Egyrészt áll egy igen gyors paraquat elektronelszívó hatásból, másrészt egy tartósabb, és rövid időn belül irreverzibilis fotoszintetikus károsodásból, ami csökkenti az aktív, működőképes reakciócentrumok számát, ezáltal idézve elő fluoreszcencia kisugárzás csökkenést. Feltételezhetően a paraquat hatás korai szakaszában az előbbi, míg a később szakaszában az utóbbi folyamatok dominálnak. Ezt mutatja az is, hogy a szenzitív növényekben a paraquat kezelést követő igen rövid időn belül (15 min) már

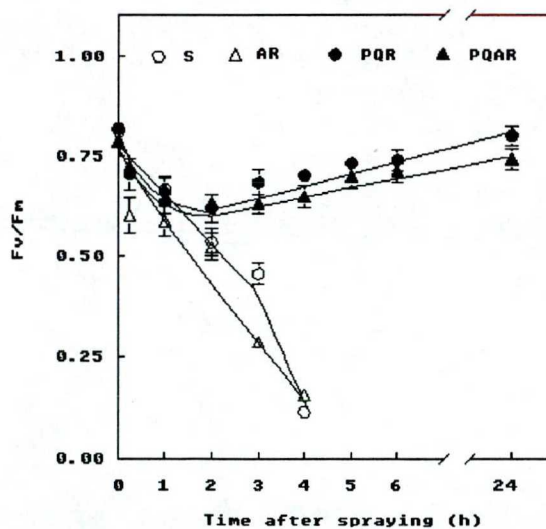


drasztikus (60-70%) változó fluoreszcencia (Fv) csökkenés tapasztalható, míg a későbbiekben további, de már lassabb ütemű csökkenés figyelhető meg. A paraquat-rezisztens biotípusok esetében a kezelést követő rövid időszakban a változó fluoreszcencia szintén gyors csökkenést mutat, ami jelzi, hogy a paraquat a rezisztens növényekbe is igen gyorsan bejut a kloroplasztiszokba és kifejti elektroneltérítő hatását.



**31.ábra:** Paraquat kezelés (0.5mM) hatása a változó fluoreszcencia (Fv) intenzitására különböző herbicid-rezisztens biotípusok esetében. Az eredmények 4 sorozat átlagát tartalmazzák.

A későbbiekben azonban a csökkenés megszűnik és mintegy 24-48h alatt visszaáll az eredeti szintre. Ez egyben azt is jelenti, hogy a paraquat bejutása a rezisztens növényekben sem korlátozott, így a paraquat csökkent mértékű transzportja, vagy elsődleges kizáródása a kloroplasztiszból a betyárkóró esetében nem lehet oka a paraquat rezisztenciának.

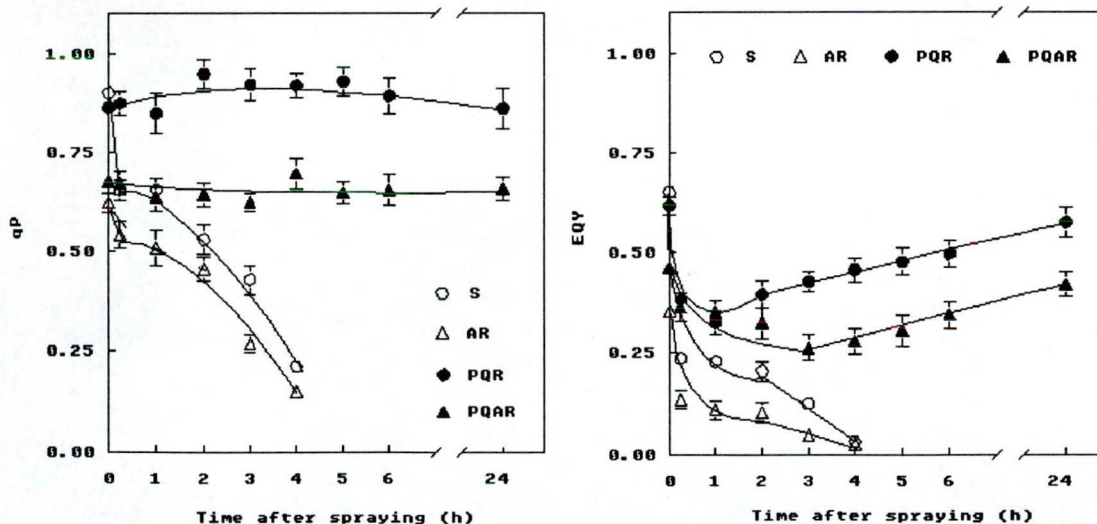


**32.ábra:** Paraquat kezelés (0.5mM) hatása az optimális kvantumhatásfok (Fv/Fm) paraméterére különböző herbicid-rezisztens biotípusok esetében. Az eredmények 4 sorozat átlagát tartalmazzák.

Ha a változó fluoreszcencia maximális fluoreszcenciához viszonyított arányát ( $F_v/F_m$ ) vesszük figyelembe, látható, hogy ebben az esetben az  $F_v/F_m$  csökkenés lassabb a szenzitív növényekben, és kisebb mértékű a rezisztens biotípusoknál, mint az  $F_v$  változása (32. ábra). (Az  $F_v/F_m$  0,8-ról 0,6-ra történő csökkenése (-25%), változatlan  $F_o$ -nál, 62,5%-os  $F_v$  csökkenés mellett figyelhető meg. ( $0,6=0,8-x/1-x$ )). Ha elfogadjuk, hogy az  $F_v/F_m$  paraméter kevésbé érzékeny a fotokémiai folyamatokkal összefüggő változásokra, inkább arányos a funkcionálisan aktív PS II reakciócentrumok számával, akkor az 32. ábra szerint a paraquat-rezisztens növényekben csak enyhe reakciócentrum károsodás tapasztalható, míg a szenzitív növényekben 1-2h múlva a fotoszintetikus apparátus károsodása már detektálható.

A paraquat jelenléte és hatása a fluoreszcencia quenching paraméterekben egyértelműen megmutatkozik. A fluoreszcencia kioltási paramétereket az előzetesen paraquat kezelt növények gyenge aktinikus fényvel ( $150-200 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ ) történő megvilágítás mellett telítési fényintenzitású flash-k segítségével határoztuk meg.

A fotokémiai kioltás és az effektív kvantumhatásfok paraméterében a paraquat hatása mellett az atrazin-rezisztens növények jellemző fotoszintetikus tulajdonságai is megmutatkoznak (alacsonyabb  $qP$  és  $EQY$ ) (33. ábra).



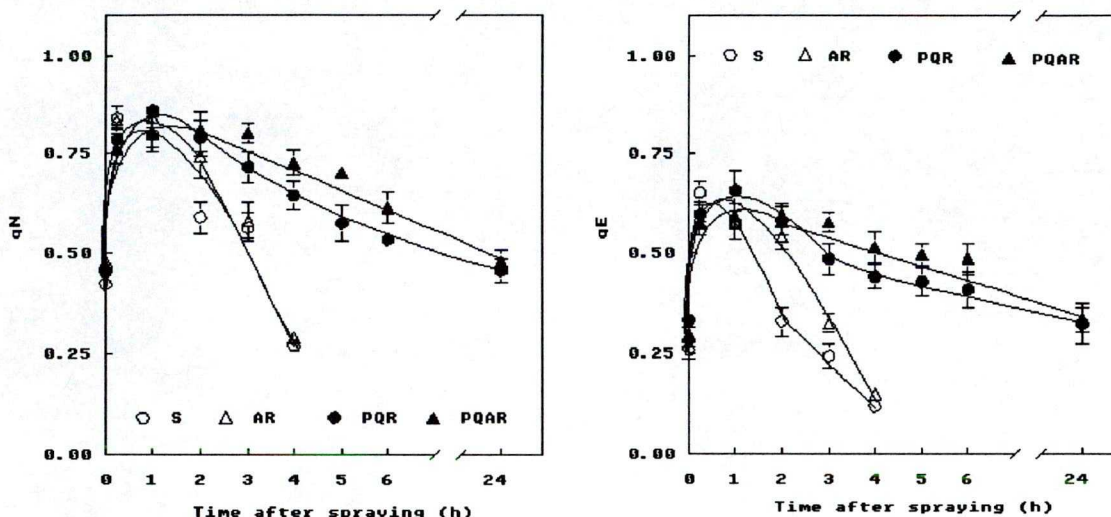
**33. ábra:** Paraquat kezelés (0.5mM) hatása a fotokémiai kioltás ( $qP$ ) és az effektív kvantumhatásfok ( $EQY$ ) paramétereire. Az eredmények 4 sorozat átlagát tartalmazzák.

A paraquat-szenzitív növényekben az  $F_v/F_m$  paraméterrel szinkronban futnak a  $qP$  és  $EQY$  paraméterek értékei, míg a paraquat-rezisztens növényekben a  $qP$  nem csökken, sőt időnként kismértékű növekedés is megfigyelhető. Ez magyarázható a paraquat elsődleges fitotoxikus hatásával, miszerint a paraquat „bekötődése” a PS I akceptor oldalára megnöveli az oxidált redoxkomponensek arányát a teljes elektrontranszport-láncban. Ezek az eredmények azt jelzik,



hogy a paraquat elektroneltérítő hatása sokkal kifejezettebb a rezisztens növényekben, mint a károsítás, míg a szenzitív növények esetében a gyors és nagyfokú károsodás drasztikus qP és EQY csökkenésben nyilvánul meg.

A paraquat elektronelszívó hatása a nem-fotokémiai kioltás paraméterében egyértelműen megmutatkozik. A paraquat kezelés hatására a qN jelentősen megnövekedett a paraquat kezelést követő igen rövid időn belül mind a paraquat-szenzitív, mind a paraquat-rezisztens biotípusok esetében. A szenzitív növényekben azonban ez igen gyorsan leesik, míg a paraquat-rezisztens növényekben tovább magas marad és csak a recovery végére tér vissza az eredeti állapotra (34. ábra).



**34. ábra:** Paraquat kezelés (0.5mM) hatása a qN és qE paraméterekre. Az eredmények 4 sorozat átlagát tartalmazzák.

A paraquat elektrontranszport stimuláló hatásából következően paraquat kezelés hatására megnő a  $\Delta pH$  a tilakoid membrán két oldala között, ami megmutatkozik a nem-fotokémiai kioltás qN és qE paramétereiben is. (Megjegyzem, hogy az NPQ ill. az ebből számolt  $qE_{NPQ}$  paraméterekből ugyanezek a következtetések vonhatók le, így ezeket nem mutatom be.) A szenzitív növények esetében azonban rövid időn belül a paraquat kezelés hatására képződő toxikus oxigéngyökök tilakoid membrán károsodást idézhetnek elő, melyek megszüntetik mind a fotokémiai, mind a nem-fotokémiai folyamatokat. Ezek alapján feltételezhető, hogy a szenzitív növényekben a paraquat kizárólagos elektronelszívó hatása csak igen rövid ideig érvényesül, mert később a membránkárosítás már olyan nagyfokú, hogy ez fotoszintetikus aktivitáscsökkenéshez vezet. Ezzel szemben a paraquat-rezisztens növények fotokémiai és nem-fotokémiai kioltási paramétere alapján feltételezhető, hogy ezekben a növényekben a károsodás mértéke igen kisfokú és a paraquat hatóhelyéről történő teljes eliminálásáig a paraquat megtartja elektronelszívó tulajdonságát.



## B A paraquat hatásának termolumineszcenciás vizsgálata

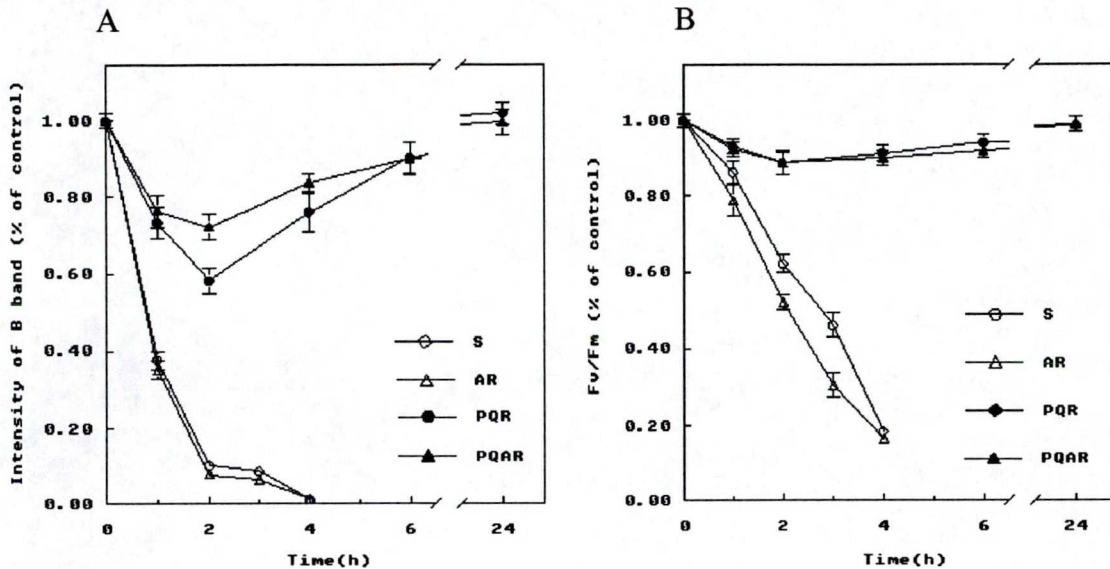
A fenti jelenség más oldalú megközelítését adják a termolumineszcenciás vizsgálatok. Az egyes sávok intenzitásának és hőmérsékleti maximumának paraquat kezelés hatására történő megváltozása újabb felvilágosítást adhat a PS II körül lejátszódó folyamatokról. Ez azon a megfontoláson alapul, hogy amennyiben a paraquat a hatóhelyén található és kifejti elektroneltérítő, elektrontranszport stimuláló hatását, a primer töltésszétválasztás után létrejövő töltésrekombináció valószínűsége is megváltozhat. Továbbá a mérőberendezés lehetővé teszi olyan magas hőmérsékletű sávok (HTL) detektálását is, ami már nem áll közvetlen összefüggésben a PS II redox komponenseinek töltésrekombinálódásával, hanem különböző lipidperoxidok, peroxid származékok képződésére utal, jelezve a károsodott fotoszintetikus apparátus jelenlétét, a lipidperoxidok képződését (Vavilin et al. 1991; Hideg and Vass 1993). Ennek valószínűsége paraquat kezelés hatására szintén megnövekedhet.

E típusú vizsgálatokban a paraquat-t 0.5mM-os koncentrációban permetezéssel jutattuk a levélfelületre és a növényeket 150-200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  s fényintenzitáson tartottuk a kísérlet végéig. A mérések megkezdése előtt minden mintát 15-20 percig sötétadaptáltuk. Ezen vizsgálatok során a 2 flash utáni B sáv, a 30 s far red kezelést követő AG sáv, valamint a magas hőmérsékletű termolumineszcencia (HTL) sáv intenzitásának paraquat kezelés hatására történő megváltozását tanulmányoztuk szenzitív, paraquat- és a paraquat/atrazin-rezisztens valamint csak atrazin-rezisztens betyárkóró biotípusokon. A HTL sáv detektálása során előmegvilágítást nem alkalmaztunk. A vizsgálatokat kiegészítettük az Fv/Fm meghatározásával.

A 2 flash hatására az  $S_2/S_3Q_B^-$  töltésrekombinációjából származó B sáv intenzitása az eddig megfigyelt  $O_2$  kiválasztás,  $CO_2$  fixálás (Lehoczki et. al. 1992) és változó fluoreszcencia (Fv) kinetikájához hasonló lefutást mutat, azaz a B sáv intenzitása gyorsan és jelentős mértékben csökken a szenzitív ill, atrazin-rezisztens növények esetében, kisebb mértékben és csak átmenetileg a paraquat-rezisztenciával rendelkező biotípusok (PQR, PQAR) esetében. A B sáv rendkívül érzékenynek mutatkozott a paraquat kezelésre, hiszen a paraquat-szenzitív növényekben 1h múlva, már mintegy 60%-os és 2h múlva már szinte 100%-os intenzitáscsökkenés detektálható (35. ábra). A B sáv intenzitásának csökkenése lehet egyrészt a paraquat primer elektroneltérítő hatásának, másrészt a PS II reakciócentrumok károsodásának a következménye. Ha a paraquat jelen van a hatóhelyén és ki tudja fejteni elektronelszívó hatását, ez csökkenti a redukált quinon-k számát, így a  $Q_B^-$  hiánya miatt csökken a primer töltésszétválasztás utáni  $S_2S_3/Q_B^-$  töltésrekombináció lehetősége. Ugyanakkor a károsodás



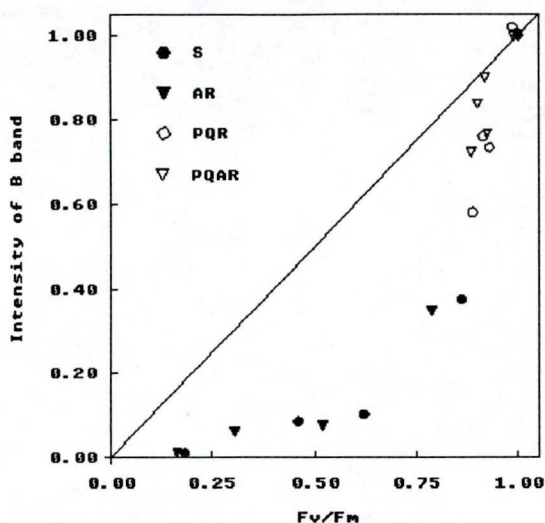
következtében a reakciócentrumok számának csökkenése csökkenti a primer töltésszétválasztás, így a töltésrekombináció valószínűségét is. Mindkét folyamat megnyilvánul a B sáv intenzitásának csökkenésében. Ez utóbbi azonban nyomon követhető az Fv/Fm paraméter detektálásán keresztül is (35. ábra, B).



**35. ábra:** A B termolumineszcencia sáv (A) és az Fv/Fm paraméter (B) intenzitásának változása paraquat kezelés hatására.

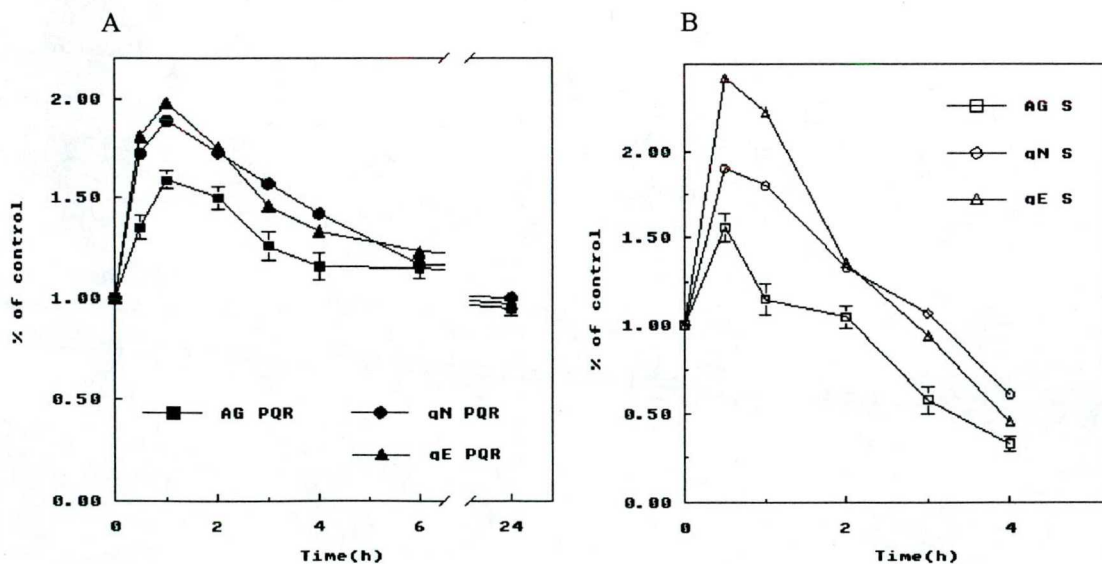
Az előző kísérletekhez hasonlóan az Fv/Fm paraméter hasonló lefutást mutat ezekben a kísérletekben is, azaz a szenzitív és atrazin-rezisztens növény irreverzibilis Fv/Fm csökkenést mutatnak, jelezve a reakciócentrumok károsodását, míg a paraquat rezisztenciával rendelkező növények esetében a primer töltésszétválasztás hatékonysága csak átmenetileg és csak kismértékben csökkent. Ha mindkét paramétert az abszolút értékek helyett a kontroll %-ában ábrázoljuk, látható hogy az Fv/Fm paraméter sokkal kevésbé változott, mint a B sáv intenzitása, jelezve, hogy a B sáv intenzitáscsökkenése csak részben értelmezhető a primer töltésszétválasztás hatékonyságának csökkenésével, jelentős mértékben meghatározó benne a  $Q_B$  oxidált állapota miatti  $S_2S_3/Q_B^-$  rekombináció valószínűségének csökkenése. Ezt mutatja a 36. ábra is, ahol a B sáv intenzitásának változása és az Fv/Fm paraméter között szeretnénk volna korrelációt kimutatni. 1 ill. 0 körüli Fv/Fm értékeknél a B sáv intenzitása arányos az Fv/Fm paraméterrel, hiszen az előbbi a kontroll (paraquat kezelés nélküli) az utóbbi a teljesen inaktív növényekre jellemző. (Az természetes, hogy a B sáv intenzitása arányos a primer töltésszétválasztás hatékonyságával, hiszen primer töltésszétválasztás nélkül nem jöhet létre töltésrekombináció sem.) Azonban a 36. ábrából az is kitűnik, hogy a közbülső értékeknél a B sáv intenzitása az Fv/Fm paraméter értékei alatt marad. Ez azt mutatja, hogy a B sáv

intenzitáscsökkenését a primer töltésszétválasztás csökkenésén túl a paraquat elektronelszívó hatása miatti  $Q_B^-$  gyors reoxidációja jelentős mértékben meghatározza.



**36.ábra:** Az optimális kvantumhatásfok és a termolumineszcencia B sáv intenzitásának kapcsolata paraquat kezelés hatására

Távoli vörös fény hatására a 40-50 °C között megjelenő AG sáv intenzitása is jelentős mértékben változik paraquat kezelés hatására. Kinetikája azonban inkább emlékeztet a qN ill. qE, mint a B sáv kinetikájára, azaz paraquat kezelést követően a sáv intenzitása nem csökken, hanem megemelkedik, majd ezt követően zuhan alá a szenzitív; és csökken vissza a kontroll értékére a paraquat rezisztens növény esetében (37.ábra).

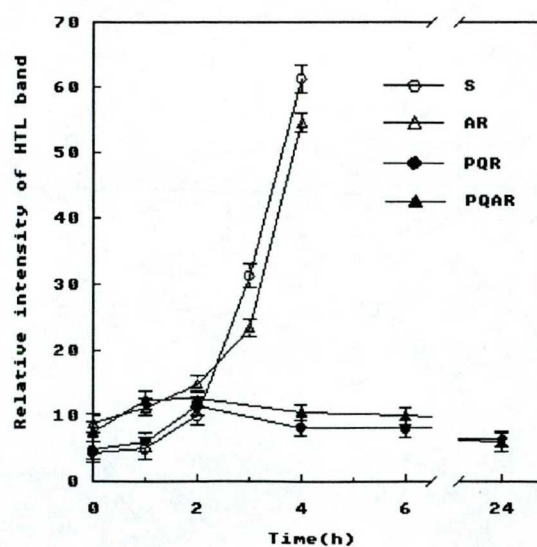


**37.ábra:** Paraquat kezelés hatása az AG sáv intenzitására, a qN és qE fluoreszcencia kioltási paraméterekre a paraquar-rezisztens (A) és szenzitív növények esetében (B).



E hasonlatosság megerősíti azt a feltételezést, hogy a far red kezelés hatására képződő AG sáv kapcsolatban hozható a nem-fotokémiai kioltási folyamatokkal is. Ezt mutatja az is, hogy nemcsak az AG sáv intenzitása, hanem hőmérsékleti maximuma is jelentősen eltolódott. Az előzetes fénykezeléshez hasonlóan (lásd I.1.2,B) az AG sáv intenzitása megemelkedik és hőmérsékleti maximuma alacsonyabb hőmérsékletek felé tolódik el paraquat kezelés hatására is (37.ábra), (a maximális hőmérsékletekre vonatkozó adatokat külön nem mutatom be). Ha figyelembe vesszük, hogy fénykezelésre intratilakoidális pH gradiens alakul ki a membrán két oldala között, valamint a paraquat kezelés is megnöveli az energia-függő quenching folyamatok mértékét (Thiele and Krause 1994), ez szintén megerősíti a fentebb említett összefüggést, miszerint az AG sáv a nem-fotokémiai kioltási folyamatokkal is összefüggésben áll.

Az igen magas hőmérsékleten (60-80°C) megjelenő TL sáv (HTL) már nem áll közvetlen összefüggésben a PS II redox komponenseinek töltésrekombinálódásával; inkább kapcsolatba hozható a lipid-peroxidáció során képződött termékeknek a klorofillal történő reakciójával. E sáv megjelenése ill. intenzitásának növekedése a károsodott fotoszintetikus apparátus jelenlétét, a lipidperoxidok képződésének mértékét jelzi (Vavilin et al. 1991; Hideg and Vass 1993; Stallaert et al. 1995). Paraquat kezelés hatására a paraquat kezelést követő két órán belül az HTL sáv intenzitása alig változik az egyes biotípusokban, 2 óra múlva azonban a HTL sáv intenzitása meredeken emelkedni kezd a szenzitív és atrazin-rezisztens növények esetében, míg a paraquat rezisztenciával rendelkező növényekben a kezdeti változásnál nagyobb mértékű növekedés nem figyelhető meg (38.ábra).



**38.ábra:** A HTL sáv intenzitásának változása paraquat kezelés hatására.

Ezek a vizsgálatok azt mutatják, hogy a paraquat másodlagos fitotoxikus hatásának (különböző toxikus gyökök képződése) dominanciája a paraquat kezelést követő 2-3 óra múlva válik jelentőssé a szenzitív növények esetében. A paraquat-rezisztens biotípusoknál az HTL sáv intenzitása nem emelkedik meg lényegesen a paraquat kezelést követő 24 órán belül. Ekkor már a paraquat-rezisztens növényekben a fotoszintetikus paraméterek jelentős javulást mutatnak, így a későbbiekben már nem is várható e sáv megemelkedése. Ez azt mutatja, hogy a paraquat-rezisztens növényekben a paraquat károsító hatása nem, vagy csak jóval kisebb mértékben tud érvényesülni, mint a szenzitív növény esetében.

A paraquat fiziológiai hatásának termolumineszcenciás vizsgálatai egyértelműbben jelzik, hogy a paraquat kezelést követően a paraquat elsődleges elektroneltérítő, elektrontranszport stimuláló hatása jelentős és meghatározó szerepű a paraquat kezelést követő kezdeti időszakban, és a drasztikus károsodási folyamatok csak később detektálhatók elsősorban a szenzitív növények esetében. A paraquat-rezisztens növényekben a paraquat primer fitotoxikus hatása a meghatározó.



### III.4 A paraquat-rezisztencia mechanizmusának tanulmányozása

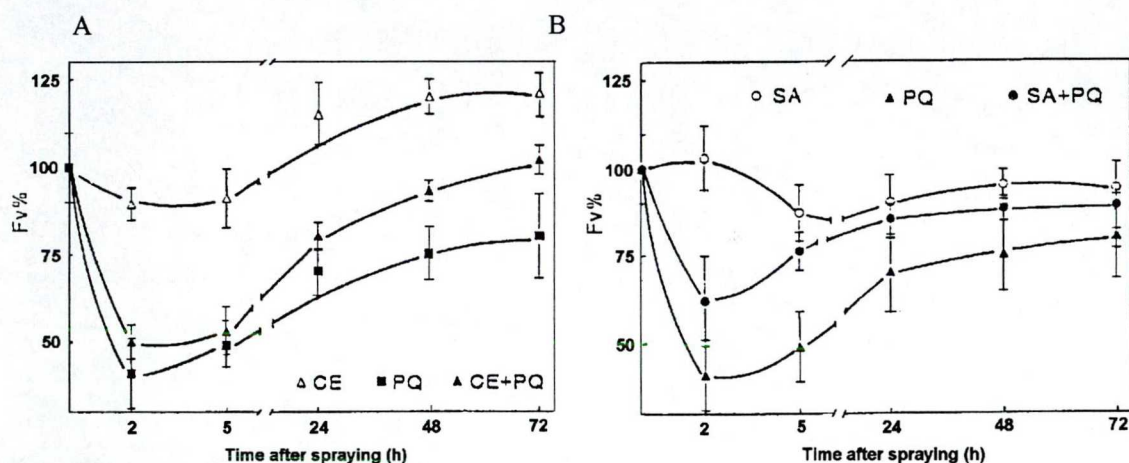
A paraquat-rezisztencia jelenségének háttérében a paraquat elsődleges, vagy másodlagos fitotoxikus hatásával összefüggő folyamatok rejlenek, amelyek során a rezisztens növényekben a paraquat okozta fitotoxikus folyamatok nem, vagy csak méréselt formában tudnak végbemenni. Ahogy azonban a bevezetőben említettem, a paraquat-rezisztencia problémája még közel sem megoldott probléma. Számos hipotézis „viaskodik” egymással, de egyik sem ad teljes magyarázatot a kérdésre. Az elsődleges kizáródás elméletei nem adnak magyarázatot a kizáródás lehetséges folyamataira, ugyanakkor a megnövekedett aktivitású antioxidáns enzimrendszer hipotézise sem biztosít elegendő magyarázatot a paraquat primer hatásának kivédésére. Az eddigi vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy a paraquat-rezisztencia oka nem lehet a paraquat elsődleges kizáródása a kloroplasztiszból, mivel a paraquat kezdetben a hatóhelyén található, és ki tudja fejteni primer elektroneltérítő hatását. A későbbiekben a regenerálódási szakaszban a paraquat eltávolodik a hatóhelyéről, primer elektroneltérítő hatása megszűnik. Ez jelentheti a paraquat, másodlagos kizáródását, eltávolodását a hatóhelyéről. Az sem kizárható, hogy a tranziens gátlás szakaszában az antioxidáns enzimrendszernek szerepe lehet a károsító folyamatok kivédésében.

A paraquat-rezisztencia mechanizmusának felderítésére irányuló kísérleteinket a paraquatnak a toxikus oxigéngyök képző, valamint a tilakoid membrán lipikárosító hatásából kiindulva végeztük. Ugyanakkor a regenerálódási szakasz jelenléte egy a paraquat kezelés hatására indukálódó folyamatra utal. Mindezekből kiindulva megvizsgáltuk számos inhibitor hatását a paraquat kezelés során létrejövő tranziens gátlás jelenségére. Ezek a zsírsavszintézist befolyásoló cerulenin, a telítetlen zsírsavak mennyiségét csökkentő SAN9785, s szuperoxid dizmutáz gátló DDC (diethyl-dithio-karbamát), kataláz inhibitor aminotriazol és két a mag ill. kloroplasztisz kódolt fehérjeszintézis gátló (cikloheximid és kloramfenikol) vegyületek voltak. Kísérleteink során a paraquatot és a különböző gátlószereket permetezéssel juttattuk a tölevélrózsás intakt növények levelére egy olyan detergens segítségével, amely önmagában nem idéz elő károsodást a növényekben, de segíti a különböző vegyületek behatolását. (Megjegyzem, hogy ugyanez a detergens található meg a paraquat kezeléseknél használt Gramaxon oldatban is.) A gátlószereket 1 mg/ml dózisban alkalmaztuk, (kiv. DDC és az aminotriazol (100mM)), míg a paraquat 0,5 mM koncentrációjú volt. A vizsgálatainkhoz itt a hagyományos elven működő fluoreszcencia indukciómérő berendezést alkalmaztuk, amivel a változó fluoreszcencia (Fv) intenzitását detektáltuk. Az itt bemutatandó kísérleteket még



paraquat/atrazin együttes rezisztenciával rendelkező biotípusokon végeztük, de később a legfontosabb kísérleteket megismételtük csak paraquat rezisztens növényeken is, hasonló eredményt kapva.

Cerulenin (de novo zsírsavszintézis gátló vegyület) kezelés hatására módosul a membránok lipidösszetétele, megnő a fluiditása. Direkt fotoszintézis-gátló hatása nem kimutatható, de csökkenti az intakt levelek fotoszintetikus aktivitását (Laskay 1986). A cerulenin kezelés hatására csökken a változó fluoreszcencia intenzitása a kezelést követő 1-5 órában, de később ez megszűnik. A paraquattal kombinált kezelések (cerulenin+paraquat) során jelentős Fv csökkenést tapasztaltunk, de a változó fluoreszcencia intenzitása nem tér el szignifikánsan a csak paraquat kezelt növényétől, megtartotta a csak paraquat kezelésre jellemző tranziens kinetikát.



**39.ábra:** Cerulenin (CE) (A) és Sandoz 9785 (SA) (B) hatása a paraquat kezelést követő változó fluoreszcencia (Fv) intenzitására paraquat-atrazin-rezisztens biotípuson. Az ábra 12 minta átlagát tartalmazza.

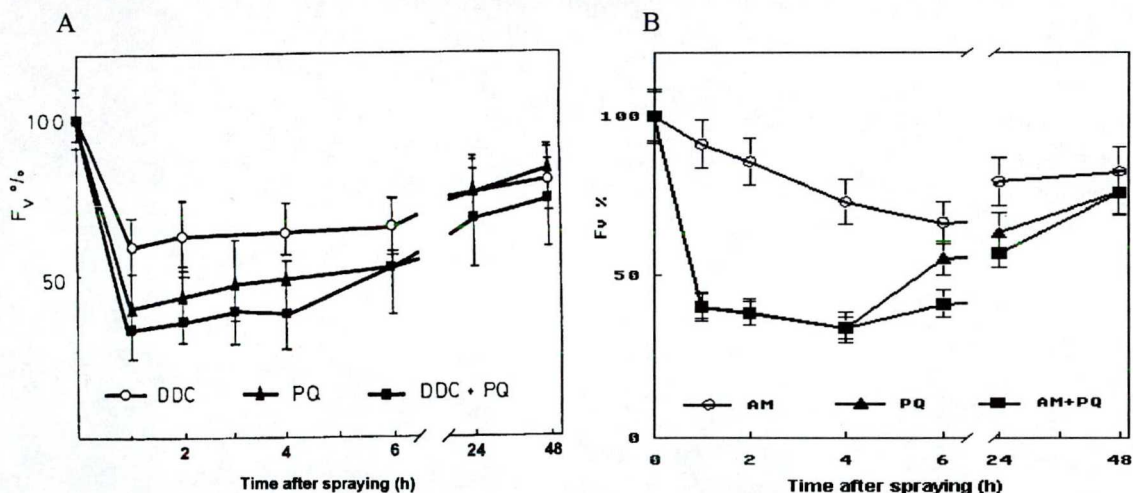
A Sandoz 9785 linolénsav deszaturáz gátló tulajdonsága mellett direkt fotoszintetikus elektrontranszport gátló hatását is kimutatták (Laskay 1986), de mindezek együttes eredményeképpen sem változtak meg a paraquat kezelés hatására létrejött tranziens gátlás folyamatai. A zsírsavszintézis gátlószerek paraquattal kombinált kezeléseinek tranziens gátlásra gyakorolt hatása azt mutatja, hogy a lipidek szerepe, ill a fotoszintetikus apparátus szigorú funkcionális épsége nem feltétele a paraquat rezisztenciának.

Fontosabb lehet a DDC (dietyl-ditio-karbamát) és az aminotriazol tranziens gátlás folyamataira gyakorolt hatásának tanulmányozása. A DDC in vivo reverzibilisen inaktíválja a Cu/Zn tartalmú szuperoxid-dizmutázt (SOD), azáltal, hogy kivonja az enzim aktív helyéről a réz ionokat. (A kloroplasztisz tartalmaz Cu/Zn tartalmú SOD-t). Hatása azonban nem specifikus,



más enzimeket (pl. glutation reduktáz, aszkorbinsav peroxidáz) és réz tartalmú fehérje komplexeket is képes inaktíválni (Michiels and Remacle 1988). Ez számunkra azért fontos, mert a fotoszintetikus elektrontranszport-lánc egyik mobilis komponense, a plasztocianin szintén réz tartalmú. Az aminotriazol gátolja a citoplazmában lévő kataláz aktivitását.

Amennyiben a szuperoxid-dizmutáznak vagy a kataláznak, vagyis az antioxidáns enzimrendszer e két tagjának, akár a tranziens gátlás, akár regenerálódás szakaszában fontos szerepe lehet ezek inaktíválása (DDC-vel, vagy aminotriazzal) jelentős mértékben megváltoztatja a tranziens gátlás kinetikáját. Az enzimaktivitás vizsgálata során egyértelműen kimutatható volt, hogy DDC és aminotriazol kezelések hatására a SOD és a kataláz enzim igen rövid időn belül és jelentős mértékben inaktíválódott (Turcsányi et al. 1998). A DDC önmaga is jelentős változó fluoreszcencia intenzitás csökkenést idézett elő a rezisztens növényekben, ami 24-48 óra múlva fokozatosan megszűnt. Az aminotriazol hatása a változó fluoreszcencia intenzitására csak kisebb mértékűnek bizonyult (40. ábra).



**40. ábra:** DDC (A) és aminotriazol (AM) (B) hatása a paraquat kezelést követő változó fluoreszcencia (Fv) intenzitására paraquat-atrazin-rezisztens biotípuson. Az ábra 12 minta átlagát tartalmazza.

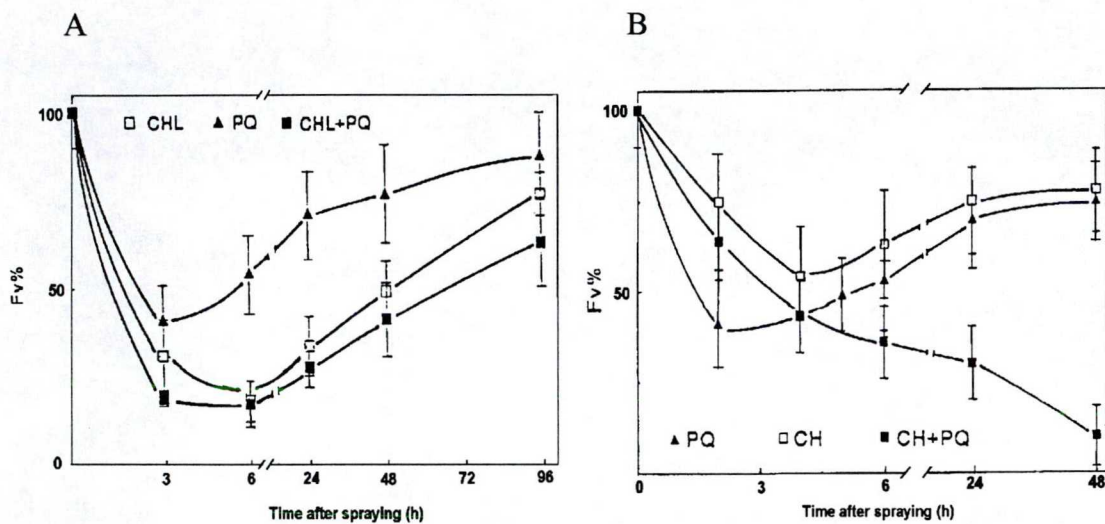
A különböző inhibitorok és a paraquat kezelt növények változó fluoreszcencia kinetikája nem tér el szignifikánsan, ami azt mutatja, sem a szuperoxid-dizmutáznak, sem a kataláznak nem lehet elsődleges szerepe a paraquat fitotoxikus hatásának kivédésében és a rezisztencia mechanizmusában (40. ábra). A SOD részletes vizsgálata során kimutattuk, hogy DDC kezelés nélkül sem volt SOD aktivitás növekedés megfigyelhető paraquat kezelés hatására, ami megerősíti a fentebb említett következtetést (Turcsányi et al. 1998).

Noha a kloroplasztisz önálló fehérjeszintetizáló apparátussal rendelkezik, fehérjéinek csak egy része kódolódik a kloroplasztiszban, mások a citoplazmában szintetizálódnak és szignál



peptidek és speciális transzporterek segítségével jutnak be a kloroplasztiszbba. A különböző helyen szintetizálódó fehérjék a fehérjeszintetizáló apparátus eltérő eredete és felépítése miatt más-más gátlószerezrel gátolhatók. A kloroplasztisz riboszómái a baktériumokéhoz állnak közel (70S), míg a magban az eukarióta típusú 80S riboszóma található. Az előbbi pl. kloramfenikollal, az utóbbi pl. cikloheximiddel gátolható. Mindkét gátlószerez csak a de novo fehérjeszintézist gátolja, a már megszintetizálódott fehérjékre nincs hatással.

A cikloheximidet és a kloramfenikolt annak eldöntésére alkalmaztuk, hogy kiderüljön, van-e szerepe valamilyen indukálódó fehérjének a paraquat rezisztencia mechanizmusában, s ha igen az hol kódolódik. Vizsgálataink kimutatták, hogy a kloroplasztisz érzékeny mindkét fehérjeszintézis gátlószerezre (41. ábra).



**41. ábra:** Kloramfenikol (CHL) (A) és cikloheximid (CH) (B) hatása a paraquat kezelést követő változó fluoreszcencia (Fv) intenzitására paraquat-atrazin-rezisztens biotípuson. Az ábra 12 minta átlagát tartalmazza.

A kloramfenikol a kezelést követően már rövid időn belül jelentős mértékben befolyásolta a rezisztens növény fotoszintetikus aktivitását. Az összes megvizsgált gátlószerez közül ez a vegyület okozta a legnagyobb Fv csökkenést, ugyanakkor a hatása a legtovább érezhető volt (41. ábra). A permetezést után csak több, mint 4 nap után állt helyre a fotoszintetikus aktivitás. Ennek oka kettős lehet. Kimutatták, hogy a kloramfenikolnak közvetlen elektrontranszportra gyakorolt hatása is van, (mint PS I elektronakceptor), ami a paraquat hatáséhoz nagyon hasonló, egyrészt mint elektrontranszport stimuláló, másrészt mint szuperoxid gyököket képző tulajdonsága lapján (Okada et al. 1991; Schnettger et al. 1994). Ez lehet az egyik oka az igen jelentős (75%-os) Fv csökkenésnek. Másrészt viszont mint fehérjeszintézis-gátló gátolhatja a plasztisz kódolt fehérjék szintézisét, köztük az igen gyors turnover-rel rendelkező D1 proteinét ( $t_{1/2}=30$  min) is. E fehérjének fontos szerepe van a PS II felépítésében, így hiánya jelentős



aktivitáscsökkenéshez vezethet (Hermann et al. 1984). A két folyamat a változó fluoreszcencia nyomon követésével nem szétválasztható. A kloramfenikol és paraquat együttes kezelések a paraquat hatás tranziens jellegét nem változtatták meg, de kinetikájában és a gátlás mélységében a csak kloramfenikol kezeltéhez áll közel. Ez arra utal, hogy noha a kloramfenikol hatása a változó fluoreszcencia intenzitására drasztikus, azonban nem befolyásolta annyira a rezisztens növényben a paraquat kezelés hatására fellépő fotoszintetikus folyamatokat, hogy annak tranziens gátlás jellege megváltozott volna. Így valószínű, hogy a rezisztencia mechanizmusában a plasztisz kódolt fehérjének nincs szerepe.

A cikloheximid kezelés hatására tapasztalható változó fluoreszcencia (Fv) intenzitás csökkenését eredményezheti közvetlen módon a magban kódolt, de a plasztiszban funkcionáló fehérjék hiánya, és/vagy közvetetten a citoplazmában zajló létfontosságú folyamatok gátlódása. Feltételezhetően ezek eredményeképpen tapasztalható a cikloheximid kezelés hatására megfigyelhető átmeneti gátlás. Az eddigi kísérletekkel ellentétben a cikloheximid és paraquat együttes kezelések nemcsak lelassítottak a tranziens gátlás folyamatát, hanem irreverzibilisen gátolták is azt. Ennek eredményeképpen 24 órán belül a paraquat kezelt szenzitív növényekhez hasonlóan kiszáradási, elhalási foltok jelentek meg a rezisztens növények levelein, majd 48 óra múlva a növény elpusztult. E megfigyelés arra utal, hogy a paraquat-rezisztens növényekben egy, vagy néhány a paraquat kezelés hatására indukálódó magkódolt fehérjének fontos szerepe lehet a paraquat-rezisztencia mechanizmusában.

A kloramfenikolra és cikloheximidre vonatkozó kezeléseket megismételtük csak paraquat-rezisztens növényekkel is, hasonló eredményt kapva.

Összefoglalva tehát elmondható, hogy megerősítve a korábbi megfigyeléseket (Lehoczki et al. 1992) a paraquat hatás kinetikai vizsgálata alapján a paraquat bejut a rezisztens növényekbe a kezelést követő rövid időn belül, jelentős fluoreszcencia intenzitás-csökkenést idézve elő, majd e hatása fokozatosan megszűnik és az eredeti fotoszintetikus aktivitás helyreáll. Így a paraquat rezisztencia oka nem lehet a paraquat elsődleges kizáródása a kloroplasztiszból. DDC-vel és aminotriazollal történt kezelések kinetikai vizsgálatai alapján elmondható, hogy noha e két vegyület inaktiválta a szuperoxid-dizmutáz és a kataláz enzimet, a paraquat-rezisztencia mechanizmusát nem befolyásolták, így az antioxidáns enzimrendszer ezen tagjai nem elsődleges fontosságúak a paraquat hatás megszüntetésében. A zsírsavszintézis gátlószerek a zsírsavanyagcserére gyakorolt hatásuk révén módosítják a membránok összetételét, a fehérjék mikrokozonyezetét, ezáltal kisebb-nagyobb fiziológiai változást idéznek elő a tilakoid membránban. Ezek azonban nem olyan jelentősek a paraquat-rezisztencia mechanizmusa

szempontjából, hogy a rezisztens növényben paraquat kezelés hatására létrejövő tranziens gátlást megakadályoznák. Szakirodalmi vizsgálatok eddig nem igazolták, hogy létezne paraquat metabolizmus, és szállító protein jelenlétét sem sikerült kimutatni, de a paraquat kezelés hatására fellépő tranziens jelenségek arra utalnak, hogy paraquat hatására indukálódnia kell valamilyen folyamatnak, ami később megakadályozza a paraquat fitotoxikus hatásának további érvényesülését. Vizsgálataink alapján kiderült, hogy ebben egy, vagy néhány magkódolt fehérjének fontos szerepe van.

A vizsgálataink ezen szakaszában még nem rendelkezünk pontos információkkal e fehérje természetére és funkciójára vonatkozóan.



#### IV. Összefoglalás

Összefoglalva a különböző herbicid-rezisztens (szenzitív (S), atrazin-rezisztens (AR), paraquat-rezisztens (PQR) és paraquat-atrazin-rezisztens (PQAR)) növények fotoszintetikus tulajdonságainak, stresszérzékenységének, valamint a paraquat fitotoxikus hatásának és a paraquat-rezisztencia mechanizmusának tanulmányozása során kapott eredményeket, a következő megállapításokat tehetjük:

1. A herbicid-rezisztens növények fotoszintetikus tulajdonságainak vizsgálata alapján megállapítható volt, hogy:

- Nincs szignifikáns különbség a különböző biotípusok pigmentösszetételében (klorofill (a+b), karotenoid tartalmában, a xantofill „pool” (Vio+Ant+Zea) méretében (Darkó et al. 1996).
- Ugyanakkor a  $\beta$ -karotin mennyisége a paraquat-rezisztens biotípusokban (PQR,PQAR) szignifikánsan alacsonyabb. Ennek szerepe a paraquat-rezisztens növények funkciójában még nem ismert.
- A külső fényintenzitás tartós megváltozására (árnyékadaptáció) a növények pigmentösszetételük és tilakoid struktúrájuk megváltoztatásával reagálnak, ami megnyilvánul a klorofill és karoteinoid tartalom megnövekedésében, a klorofill a/b arány és a xantofill ciklus pigmentek mennyiségének csökkenésében (Darkó et al. 1995). Ezek a változások azonban egységesen megfigyelhetők minden biotípus esetében.
- Rövid idejű magas fényintenzitású (1h, 1500 $\mu$ mol/m<sup>2</sup>s) kezelés hatására a pigmentösszetétel nem változik jelentősen, a xantofill ciklus pigmentjeinek átalakulása (violaxantin $\rightarrow$ zeaxantin) azonban kimutatható. Ez jelentős a szenzitív növények (S, PQR) ( $E_i = 0,22$  (S) ill. 0,32 (PQR) esetében, de korlátozott mértékű az atrazin-rezisztenciával rendelkező biotípusokban ( $E_i = 0,55$  (AR) és 0,5 (PQAR) (Darkó et al. 1995)
- Továbbá magas fényintenzitású kezelés hatására a  $\beta$ -karotin mennyiségének csökkenése is megfigyelhető biotípustól függetlenül.

Így a különböző biotípusok pigment és tilakoid szerkezetének vizsgálata alapján elmondható, hogy a néhány atrazin-rezisztens növényen megfigyelhető pigmentösszetételbeli és strukturális változások (Burke et al. 1982; Lemoine et al. 1986) a betyárkóró esetében nem tapasztalhatóak és a biotípusok között fennálló funkcionális különbségekért nem ezek a tényezők a felelősek.

A paraquat-rezisztens növények vizsgálata azt mutatja, hogy a  $\beta$ -karotin mennyiségének csökkenésén kívül egyéb pigmentösszetételbeli és strukturális változás nem figyelhető meg ezekben a biotípusokban.

Az atrazin-rezisztens növények fotoszintetikus tulajdonságainak összehasonlítása során megállapítható volt, hogy a D1 protein mutációja következtében fellépő akceptor oldali változások mellett jelentős módosulások tapasztalhatók a donor oldal működésében is. Ezek megnyilvánulnak az oxigén kiválasztó rendszer működésében, a fluoreszcencia indukció paramétereiben, valamint a termolumineszcencia jel tulajdonságaiban is:

- A különböző biotípusok in vivo mért fluoreszcencia indukciós görbéi jól mutatják az atrazin-rezisztens növényekre jellemző gyors indukciós görbe megváltozását (I szint megnövekedése), ami kapcsolatba hozható a  $Q_A$ - $Q_B$  közti elektrontranszport folyamatok ill. a  $Q_A^-$  reoxidációjának lelassulásával. Ezt a folyamatot a paraquat-rezisztencia jelenléte nem befolyásolja. Ezek az eredmények jól korrelálnak az izolált kloroplasztiszokon mért korábbi eredményekkel (Demeter et al. 1985).
- A különböző biotípusok lassú fluoreszcencia görbéinek összehasonlítása azt mutatja, hogy az atrazin-rezisztenciával rendelkező biotípusok (AR, PQAR) steady-state fluoreszcencia szintje szignifikánsan magasabb, mint a atrazin-szenzitív (S, PQR) biotípusoké, ami a (fotokémiai és nem-fotokémiai) kioltási folyamatok részarányának csökkenésére, ill. az atrazin-rezisztens növények csökkent mértékű fotoszintetikus aktivitására utal.
- Demeter et al. (1985) kloroplasztiszokon végzett vizsgálataival összhangban az atrazin-rezisztens növények termolumineszcencia B sávja alacsonyabb hőmérséklet felé tolódott el, amit a  $Q_B/Q_B^-$  középponti redoxpotenciáljának megváltozásával értelmeztek.
- Ugyanakkor a  $Q_B$  bekötődés affinitáscsökkenése, valamint az oxigén kiválasztó rendszer eltérő működése az intakt leveleken mért B sáv intenzitásának csökkenését eredményezte az atrazin-rezisztens biotípusoknál.
- A B sáv csökkenésével párhuzamosan az atrazin-rezisztens növényekben egy újabb, alacsony hőmérsékleten (0-5°C között) megfigyelhető sáv (Q) jelenik meg, ami a  $Q_A^-$  reoxidációjának lelassulása következtében fennmaradó  $S_2Q_A^-$  töltéspárok rekombinációjából származhat. Mindezek a jelenségek feltételezik, hogy in vivo az elektrontranszport folyamatok jóval lassabbak lehetnek, mint in vitro izolált rendszerekben.



- A flash-sorozat indukálta termolumineszcencia jel intenzitásának csökkenése és oszcillációjának megváltozása mutatja az atrazin-rezisztens növényekben az akceptor oldal módosulása mellett a donor oldal megváltozott működését is.
- Távoli vörös (FR) kezelés hatására az AG sáv intenzitásának jelentős csökkenése tapasztalható az atrazin-rezisztenciával rendelkező biotípus esetében. A mutáció következtében azonban, a B sávval ellentétben, e sáv hőmérsékleti maximuma nem tolódik el. Ugyanakkor előzetes megvilágítás hatására az AG sáv intenzitása megnőtt és hőmérsékleti maximuma alacsonyabb hőmérsékleteken figyelhető meg. A távoli vörös fény indukálta folyamatok termolumineszcenciás vizsgálata azt sugallja, hogy a termolumineszcencia jel kialakításában a gyors PS II akceptor és donor oldali töltésrekombinációk mellett az egész fotoszintetikus apparátus működését érintő, az előzőeknél lényegesen lassabb folyamatok is szerepet játszhatnak. Ebben fontos szerepe lehet a tilakoid membrán két oldala között kialakuló  $\Delta pH$  különbségnek.

Az eddig bemutatott fotoszintetikus folyamatok közös jellemzői, hogy ezek tulajdonságait a psbA génben lévő mutáció jelenléte befolyásolta. A paraquat-rezisztenciának ezekben a folyamatokban nem volt meghatározó szerepe.

## 2. Herbicid-rezisztens növények stresszérzékenysége.

A különböző herbicid-rezisztens növények fény-függő fotoszintetikus folyamatainak vizsgálatai arra irányultak, hogy kiderítsük, mi lehet az oka az atrazin-rezisztens növény nagyobb fényérzékenységének és magas fényintenzitással szembeni csökkent toleranciájának.

A fényérzékenységi vizsgálatok során megállapítható volt, hogy:

- A korábbi eredményekkel összhangban a primer töltésválasztás hatékonysága nem tér el szignifikánsan a biotípusok között és a rövid idejű (15 min) különböző fényintenzitású fénykezelések nem idézik elő a fotoszintetikus apparátus károsodását (Darkó et al. 1995; Darkó et al. 1996).
- Ugyanakkor a mutáció következtében a  $Q_A$ - $Q_B$  közti elektrontranszport lelassulása, valamint a  $Q_B$  reoxidációjának csökkenése miatt a fényenergia fotokémiai folyamatokban történő hasznosulása csökken az atrazin-rezisztens biotípusokban. Ez megmutatkozik a  $Q_A$  redukáltsági fokát tükröző fotokémiai kioltás (qP) paraméterében. (Váradi et al. 1994; Darkó et al. 1995; Darkó et al. 1996).

- Annak ellenére, hogy a  $Q_A$ - $Q_B$  közötti elektronátadás a teljes fotoszintetikus apparátus működéséhez viszonyítva gyors folyamat, a PS II akceptor oldali módosulása kihatással van az egész fotoszintetikus elektrontranszport-lánc működésére, ami megnyilvánul a lineáris elektrontranszport-lánc egyensúlyi szintű működése során mért PS II effektív kvantumhatásfok ( $\Delta F/F_m'$ ) paraméterének, valamint a  $CO_2$  fixálás hatékonyságának csökkenésében (Darkó et al. 1995; Darkó et al. 1996).
- A csökkent fotoszintetikus aktivitású elektrontranszport egyrészt megnöveli az alternatív folyamatok (fluoreszcencia és hő formájában történő energia-kisugárzás) valószínűségét, ami megmutatkozik a fluoreszcencia steady-state szintjének megemelkedésében, valamint alacsony fényintenzitáson az atrazin-rezisztens növényekre jellemző magasabb  $q_N$  (NPQ) értékekben. Másrészt viszont az elektrontranszport lassulás kisebb  $\Delta pH$ -t hoz létre a tilakoid-membrán két oldala között, így az energia-függő kioltási ( $q_E$ ) folyamatok részesevé a nem-fotokémiai kioltási folyamatokban lecsökken. Ez magas fényintenzitásokon már drasztikus  $q_N$  csökkenéshez vezethet (Darkó et al. 1995; Darkó et al. 1996).
- Azt is megállapítottuk, hogy a xantofill ciklus pigmentek konverziója (violaxantin  $\rightarrow$  zeaxantin) csökkent mértékű az atrazin-rezisztens növényekben (Darkó et al. 1996). További vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy ennek oka nem az enzimből bekövetkező módosulás, mivel sem az in vitro mért violaxantin de-epoxidáz enzim aktivitásában, sem a paraquat kezelés hatására megfigyelhető xantofill ciklus aktivitás megnövekedésében nincs eltérés a biotípusok között. Ez arra utal, hogy az atrazin-rezisztens növényekben a lassabb elektrontranszport működés következtében kialakuló kisebb  $\Delta pH$  felelős a xantofill ciklus csökkent aktivitásáért. Ez egyben azt is jelenti, hogy az energia-függő kioltási folyamatokban a xantofill ciklus működésének magas fényintenzitásokon meghatározó szerepe van.

Míndezek az eredmények magyarázatul szolgálhatnak az atrazin-rezisztens növényekben megfigyelhető nagyobb fényérzékenységre.

- A paraquat-rezisztenciával rendelkező biotípusok fényérzékenységi vizsgálatai alapján megállapítható, hogy a paraquat-rezisztenciának nincs számottevő hatása a fotoszintetikus elektrontranszport folyamatokra és a nem-fotokémiai kioltásban megnyilvánuló fotoprotektív mechanizmusokra.



Ezekkel az eredményekkel összhangban a fénygátlás folyamatainak tanulmányozása során megállapítható volt, hogy:

- A tartósan magas fényintenzitású kezelés a fotoszintetikus apparátus drasztikusabb károsodását idézte elő az atrazin-rezisztens növényekben, ami az Fv/Fm és Fo paraméterek nagyobb mértékű csökkenésében ill. növekedésében nyilvánult meg. Ezzel párhuzamosan a xantofill ciklus aktivitása is csökkent mértékű volt ezekben a biotípusokban. A fénygátlás megszűnése után a fotoszintetikus aktivitás jelentős része gyorsan helyreáll mind a négy biotípus esetében. A gyors regenerálódási folyamatban zajlik le a xantofill ciklus pigmentek visszaalakulása is (Váradi et al. 1996).
- Különböző inhibitorok (DTT, sztreptomycin) hatásainak tanulmányozása során kimutatható volt, hogy a különböző gátlószerek eltérő mértékben hatnak az atrazin-szenzitív és atrazin-rezisztens növényekre. Ez arra utal, hogy a különböző fotoprotektív folyamatok részesedése az egyes biotípusok esetében más és más lehet: Az atrazin-szenzitív növények különösen érzékenyen reagáltak a DTT kezelésre, míg az atrazin-rezisztens növények esetében a sztreptomycin kezelés hatására figyelhető meg nagyobb változás.
- A DTT nagyobb változást idézett elő az atrazin-szenzitív növények fotoszintetikus paramétereiben (Fv/Fm, qP, EQY), jelezve, hogy az ezekben a növényekben jól működő xantofill ciklus inaktiválása jelentős fotoszintetikus aktivitáscsökkenést idézett elő, így a xantofill ciklusnak a nagy fényintenzitású károsító folyamatok kivédésében rendkívül nagy szerepe van ezekben a biotípusokban. Ezt támasztja alá az is, hogy az atrazin-szenzitív növények fotoszintetikus paraméterei DTT kezelés hatására az atrazin-rezisztens növények fotoszintetikus paramétereikhez váltak hasonlóvá. Ez egyben jelzi, hogy az atrazin-rezisztens növények magas fényintenzitás okozta fotoszintetikus aktivitáscsökkenéséért a xantofill ciklus aktivitásának hiánya nagymértékben felelőssé tehető.

### 3. Paraquat fotoszintetikus elektrontranszportra gyakorolt hatásának tanulmányozása.

A paraquat fitotoxikus hatása kettős. Egyrészt kötődve a PS I akceptor oldalához stimulálja a fotoszintetikus elektrontranszport-lánc működését. Másrészt toxikus gyököket generálva igen erős oxidatív stresszfolyamatokat vált ki a növényekben. E kettős, a fotoszintetikus elektrontranszport-lánc működésére ellentétes hatást kiváltó folyamatokat tanulmányoztuk különböző herbicid-rezisztens növényeken fluoreszcencia quenching analízis és termolumineszcencia módszerével.

- A fluoreszcencia quenching analízisek eredményei alapján egyértelműen kimutatható a paraquat jelenléte a kloroplasztiszban mind a négy biotípus esetében. Ugyanakkor ezek megnyilvánulása a quenching paraméterekben jelentősen eltér a paraquat-szenzitív és paraquat-rezisztens növények esetében.
- A paraquat-szenzitív biotípusokban a paraquat kezelést követő 1-2 óra múlva a károsító folyamatok kerülnek előtérbe, addig a paraquat-rezisztens növényekben a károsodás mértéke igen kisfokú és a paraquat elektrontranszport stimuláló tulajdonsága a meghatározó.
- A paraquat-szenzitív növényekben a fotokémiai (qP) és effektív kvantumhatásfok (EQY) szigorú csökkenése figyelhető meg paraquat kezelés hatására, ugyanakkor a paraquat-rezisztens növényekben a qP nem csökken. Ez a paraquat elektrontranszportra gyakorolt hatásának eredménye.
- Paraquat elektrontranszport stimuláló tulajdonságának köszönhetően a nem-fotokémiai kioltási (qN) és energia-függő kioltási (qE) folyamatok intenzitásának megnövekedése tapasztalható a paraquat kezelést követő rövid időn belül mind a négy biotípus esetében. Ez azt jelzi, hogy a paraquat kezelés hatására a paraquat intratilakoidális pH növekedést indukál mindegyik biotípus esetében. A későbbiekben azonban a paraquat-szenzitív biotípusokban a tilakoid-membrán károsodása következtében ez gyorsan megszűnik. Ugyanakkor a paraquat-rezisztens növényekben e paraméterek tartós megnövekedése figyelhető meg, ami csak lassan és folyamatosan csökken. Ez továbbra is megerősíti azt a feltételezést, hogy a paraquat-rezisztens növényekben a károsodás mértéke igen kisfokú és a paraquat hatóhelyéről történő eliminálásáig megtartja elektrontranszport stimuláló tulajdonságát.
- A paraquat-szenzitív növényekben a paraquat hasonló hatást váltott ki a fluoreszcencia quenching paramétereire ( $F_v/F_m$ , qP, qN), mint a magas fényintenzitású kezelések. Érdekes megfigyelés azonban, hogy a paraquat a elsődleges és másodlagos fitotoxikus hatásai megszüntetik a szenzitív és atrazin-rezisztens növények közti alapvető fotoszintetikus aktivitásbeli különbségeket. Ennek magyarázata még nem ismert, de ezek vizsgálata hozzájárulhat az atrazin-rezisztens növény fotoszintetikus tulajdonságainak megértéséhez.
- A paraquat hatásának termolumineszcencia vizsgálatai alapján kimutatható volt, hogy a  $S_2/S_3Q_B^-$  rekombinációjából eredő B sáv intenzitása gyorsan, jelentős mértékben és irreverzibilisen csökkent a paraquat-szenzitív növényekben, míg csak kisebb mértékben és átmenetileg a paraquat-rezisztens biotípusokban. Ez egyrészt a paraquat elektrontranszport



stimuláló tulajdonságának, másrészt a PS II reakciócentrumok károsodásának a következménye lehet.

- A B sáv intenzitáscsökkenése azonban csak részben értelmezhető a primer töltésválasztás hatékonyságának csökkenésével, jelentős mértékben meghatározó benne a  $Q_B$  oxidált állapota miatti  $S_2/S_3Q_B^-$  rekombináció valószínűségének csökkenése. Ezt az optimális kvantumhatásfok ( $F_v/F_m$ ) paraméter és a B sáv közti korreláció egyértelműen mutatja.
- A paraquat kezelés hatása a távoli vörös fény indukálta AG sáv képződésére újabb bizonyítékul szolgál az AG sáv és a nem-fotokémiai kioltási folyamatok kapcsolatára. Ezt mutatja, hogy paraquat kezelés hatására az AG sáv kinetikája hasonló lefutást mutatott, mint a  $q_N$  és  $q_E$  ugyanolyan kezelésre adott kinetikája. Ezt erősíti továbbá, hogy az AG sáv hasonló módon változott akkor, amikor az intratilakoidális pH megnövekedését idéztük elő akár magas fényintenzitású előkezelés, akár paraquat hatására.
- A HTL sáv vizsgálata alapján egyértelműen kimutatható, hogy a paraquat oxigén gyököket képző fitotoxikus hatása csak a paraquat-szenzitív növényekben jelentkezik lipid- és a fotoszintetikus pigmentek károsodásának formájában, a paraquat-rezisztens növényekben ilyen típusú károsodás nem detektálható.

Ezek a vizsgálatok azt mutatják, hogy a paraquat bár meghatározott ideig jelen van a PS I akceptor oldalán, feltételezhetően a paraquat-rezisztencia mechanizmusa alapján a toxikus oxigén gyök képző hatása csak kismértékben, vagy egyáltalán nem érvényesül a paraquat-rezisztens növényekben.

Mind a fényfüggő folyamatok tanulmányozása, mind a paraquat hatásának vizsgálata egyértelműen jelzi, hogy a két rezisztencia (atarzin- és paraquat-rezisztencia) független egymástól, és, hogy egyik rezisztencia sem gyakorol hatást a másik által determinált folyamatokra.

#### 4. Paraquat-rezisztencia mechanizmusának vizsgálata.

Annak ellenére, hogy számos hipotézis létezik a paraquat-rezisztencia mechanizmusára vonatkozóan, a paraquat-rezisztencia oka még nem bizonyított. Az eddig is bemutatott paraquat-rezisztens növények esetében a különböző fotoszintetikus paraméterek ( $CO_2$ ,  $O_2$ ,  $F_v$ ) átmeneti csökkenése, valamint fény- (Lehoczki et al. 1992) és hőmérséklet érzékenysége

(Lasztity et al. 1998) feltételezi, hogy a paraquat gyorsan bejut a kloroplasztiszba a rezisztens növények esetében is, így a paraquat elsődleges kizáródása nem lehet az oka a paraquat-rezisztenciának, valamint, hogy a paraquat-rezisztencia mechanizmus hátterében a paraquat-kezelés hatására indukálódó metabolikus eredetű folyamatok állnak.

Ezek felderítésére irányuló kísérleteink során megvizsgáltunk számos inhibitor hatását a paraquat kezelés hatására létrejövő tranziens gátlás jelenségére. E vizsgálatok során megállapítottuk, hogy

- Cerulenin (de novo zsírsavszintézis gátló) valamint Sandoz 9785 (linolénsav deszaturáz gátló) vegyületek a zsírsavanyagcserére és a fotoszintetikus elektrontranszport működésére gyakorolt hatásuk ellenére sem változtatták meg a rezisztens növényekben paraquat kezelés hatására megfigyelhető tranziens gátlás folyamatait. Ez azt mutatja, hogy a lipidek szerepe ill. a fotoszintetikus apparátus szigorú funkcionális épsége nem feltétele a paraquat-rezisztenciának.
- Az antioxidáns enzimeknek fontos szerepe lehet a paraquat fitotoxikus hatásának eliminálásában. Azonban a szuperoxid-dizmutáz (SOD), mint a kloroplasztiszban is megtalálható antioxidáns enzimrendszer első komponense, valamint a kataláz, citolazmában ható enzim inaktiválása (DDC és aminotriazol inhibitorok segítségével) nincs hatással a paraquat kezelés indukálta tranziens gátlás folyamataira oly mértékben, hogy az meghatározó lehetne a paraquat-rezisztencia mechanizmusa szempontjából (Turcsányi et al. 1998).

A paraquat hatására indukálódó metabolikus folyamatok alapján megvizsgáltunk két fehérjészintézis-gátló vegyület (kloramfenikol, cikloheximid) hatását a tranziens gátlás folyamatára annak eldöntésére, hogy van-e szerepe valamilyen indukálódó fehérjének a paraquat-rezisztencia mechanizmusában és az hol kódolódik.

- Vizsgálataink kimutatták, hogy a kloroplasztisz érzékeny mindkét gátlószerre, ami megnyilvánul abban is, hogy mindkét gátlószer önmagában jelentős fotoszintetikus aktivitáscsökkenést idézett elő. Ennek ellenére a kloramfenikol és paraquat együttes kezelése a paraquat hatás tranziens jellegét nem változtatták meg. Ez arra utal, hogy a paraquat-rezisztencia mechanizmusa szempontjából a plasztisz kódolt fehérjéknek nincs szerepe.
- A cikloheximid és paraquat együttes kezelése azonban a paraquat okozta tranziens gátlás folyamatait irreverzibilissé változtatták és a szenzitív növényekben tapasztalt hatásokhoz



hasonlóvá tették. Ez arra utal, hogy a paraquat-rezisztens növényekben a paraquat kezelés hatására indukálódó magkódolt fehérje(k)nek fontos szerepe lehet a paraquat-rezisztencia mechanizmusában.

## Irodalomjegyzék

- Ahrens W.H.** and Stoller E.W. (1983) Competition, grown rate and CO<sub>2</sub> fixation in triazine-susceptible and resistant smooth pigweed (*Amarathus hybridus*). *Weed Sci.* 31, 438-444.
- Akhavein A.A.** and Linscott D.L. (1966) The dipyridium herbicides, paraquat and diquat. *Residue Rev.* 23, 97-145.
- Allen, J.F.**, (1992) Protein phosphorilation in regulation of photosynthesis. *Biochin. Biophys. Acta* 1098: 275-335.
- Arnold W.A.** and Sherwood H.K. (1957) Are chloroplast semiconductot? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 43, 105-114.
- Aro E.M.**, McCaffery S. and Anderson J.M. (1993) Photoinhibition and D1 protein degradation in peas acclimated to different grown irradiances. *Plant Physiol.* 103, 835-846.
- Asada K.** (1994) Mrchanisms for scavenging reactive molecules generated in chloroplasts under light stress. In: *Photoinhibition of photosynthesis.* eds. Baker J.R. and Bowyer pp. 129-142.
- Babbs C.F.**, Pham J.A. and Coolbaugh R.C. (1989) Lethal hydroxil radical production in paraquat-treated plants. *Plant Physiol.* 90, 1267-1270.
- Barber J.** and Andersson B (1992) Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem Sci.* 17, 61-66.
- Baydoun E.A.H.** and Brett C.T. (1988) Properties and possible physiological significance of cell wall calcium binding in etiolated pea epicotyls. *J. Exp. Bot.* 39, 199-208.
- Bertsch W.F.** and Azzi J.R. (1965) A relative maximum in the decay of long-term delayed light emission from the photosynthetic apparatus. *BBA*, 94, 15-26.
- Bihari F.**, Kádár A., Dimitrievics Gy. és Bíró K. (1983) Gyomírtás, vegyszeres termésszabályozás. *Mg Kiadó*, 95-98.
- Bilger, W.**, Björkman, O. (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection eluciated by mesurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.* 25: 173-185.
- Bilger, W.**, Björkman, O. (1991) *Planta* 184: 226-234.
- Bishop T.**, Powles S.B. and Cornic G. (1987) Mechanism of paraquat resistance in *hordeum glaucum*.II. Paraquat uptake and translocation. *AJPP.* 14, 539-547.
- Björn L.O.** (1971) Far red induced long lived afterglow from photosynthetic cells. Size of afterglow unit and paths of energy accumulation and dissipation. *Photochem. Photobiol.* 13, 5-20.
- Boller T.A.** and Wiemken A. (1986) Dynamics of vacuolar compartmentation. *Ann. Rev. Plant Phisiol.* 37, 137-164.
- Bowes, J.**, Crofts, A.R., Arntzen, C.J. (1980) Redox reaction on the reducing side of Photosystem II in chloroplasts with altered herbicides-binding properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 200:303-308
- Bratt Ch.E.**, Arvidsson P.O., Carlsson M. and Akerhund H.E. (1995) Regulation of violaxanthin de-epoxidase activity by pH and ascorbate concentration.
- Bray D.F.**, Bagu J.R. and Nakamura K. (1993) Ultrastucture of *Chlamidomonas reinhardii* following exposure to paraquat. Comparison of wild type and a paraquat resistant mutant. *Can. J. Bot.* 71, 174-182.
- Burke, J.J.**, Wilson, F., Wafford, J.R. (1982) Characterisation of chloroplasts isolated from triazine-susceptible and triazine-resistant biotypes of *Brassica campestris L.* *Plant Physiol.* 70:24-29
- Carr R.J.G.**, Bilton R.F. and Atkinson T. (1985) Mechanism of biodegradation of paraquat by *Lipomyces starkeyi*. *Appl. Env. Microbiol.* 49, 1290-1294.



- Chun J.C.**, Kim S.E. and Ma S.Y. (1997) Inactivation of paraquat by an aqueous extract of *Rehmannia glutinosa*. *Pest. Sci.* 50, 5-10.
- Conrad, S.G.**, Radosevich, S. R. (1979) Ecological fitness of *Senecio vulgaris* and *Amaranthus retroflexus* biotypes susceptible or resistant to atrazine. *J. Applied Ecology*. 16: 171-177
- Curwiel V.B.**, Schansker G., de Vos O.J. and van Rensen J.J.S. (1993) Comparison of photosynthetic activities in triazine-resistant and susceptible biotypes of *Chenopodium album*. *Z Naturforsch* 48c, 278-282
- Darkó É.**, Váradi Gy., Hargitai A., Nagy E. and 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: *Photosynthesis from light to Biosphere* ed. P Mathis, Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London Vol. IV. 191-194.
- Darkó, É.**, Váradi, Gy., Dulai, S., Lehoczki, E. (1996) Atrazine-resistant biotypes of *Conyza canadensis* have altered fluorescence quenching and xanthophyll cycle pattern. *Plant Physiol. Biochem.* 34(6): 843-852.
- Dau, H.** (1994) Short-term adaptation of plants to changing light intensities and its relation to photosystem II photochemistry and fluorescence emission. *J. Photochem. Photobiol. b: Biol.*:26: 3-27.
- Debus R.J.** (1992) The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *BBA.* 1102, 296-352.
- Demeter S.** and Vass I (1984) Charge accumulation and recombination in PS II studied by thermoluminescence I. Participation of the primary acceptor A and secondary acceptor B in the generation of thermoluminescence of chloroplasts. *BBA.* 764. 24-32.
- Demeter S.**, Vass I, Horváth G. and Laufer A. (1984) Charge accumulation and recombination in PS II studied by thermoluminescence. II. Oscillation of the C band by flash excitation. *BBA* 764. 33-39.
- Demeter S.**, Vass I, Híged É, Sallai A. (1985a) Comparative thermoluminescence study of triazine-resistant and susceptible biotypes of *erigeron canadensis*. *BBA*, 806, 16-24.
- Demeter S.**, Rózsa Z., Vass I. and Hideg É. (1985b) Thermoluminescence study of charge recombination in PS II at low temperature II. Oscillation properties of the Z and A thermoluminescence bands in chloroplasts dark adapted for various time periods. *BBA.* 809, 379-387.
- Demmig-Adams B.**, Winter K., Krüger A. and Czygan F.C. (1987) Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. *Plant Physiol.* 84, 218-224.
- Demmig-Adams, B.** (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: A role of the xanthophyll zeaxanthin. *BBA*, 1020, 1-24.
- Demmig-Adams, B.** (1990) Zeaxanthin-associated energy dissipation and the susceptibility of various organisms to light stress. In: Baltscheffsky M. (ed) *Current research in Photosynthesis*, Vol.2, pp. 357,364. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Demmig-Adams B.** and Adams W.W. 1990 The carotenoid zeaxanthin and 'high-energy-state quenching' of chlorophyll fluorescence. *Photosynth Res* 25, 187-197.
- Demmig-Adams B.**, Adams W.W., Heber U. Neimanis S. Winter K., Krüger A., Czygan F.C., Bilger W. and Björkmann O. (1990) Inhibition of zeaxanthin formation and of rapid changes in radiationless energy dissipation by DDT in spinach leaves and chloroplasts. *Plant Physiol.* 92, 293-301.
- Demmig-Adams B.** and Adams W.W. 1992 Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43, 599-626.
- 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, J., Ort, D.R.** (1988) Enhanced susceptibility of photosynthesis to high leaf temperature in triazine-resistant *Solanum nigrum* L.: evidence for photosystem II D<sub>1</sub> protein site of action. *Plant Sci.* 56:39-48
- Dulai S., Molnár I. and Lehoczki E.** (1998) effects of growth temperature of 5 and 25 °C on long-term responses of photosystem II to heat stress in atrazine-resistant and susceptible biotypes of *Erigeron canadensis*. AJPP, (in press)
- Dumelin E.E. and Tapel A.L.** (1977) hydrocarbon gases produced during in vitro peroxidation of polyunsaturated fatty acids and decomposition of preformed hydroperoxides. *Lipids.* 12, 894-899.
- Duysens L.N. and Sweers H.E.** (1963) Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. In: *Studies on microalgae and photosynthetic bacteria.* pp. 353-372.
- Farineau J.** (1993) compared thermoluminescence characteristics of pea thylakoids studied in vitro and in situ (in leaves). The effect of photoinhibitory treatments. *Phot. Res.* 36, 25-34.
- Foyer C.H., Dujardin M. and Y. Lemoine** (1989) Responses of photosynthesis and the xanthophyll and ascorbate-glutathione cycles to changes in irradiance, photoinhibition and recovery. *PPB,* 27, 751-760.
- Frank H., Cua A., Chynwat V., Young A., Gosztola D. and Wasielewski M.R.** 1994 Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis. *Photosynth Res* 41, 389-395.
- Fuerst E.P., Nakatani H.Y. Dodge A.D., Penner D. and Arntzen C.J.** (1985) Paraquat resistance in *Coryza*. *Plant Physiol.* 77, 984-989.
- Fuerst E.P. and Vaughn K.C.** (1990) Mechanism of paraquat resistance. *Weed Techn.* 4, 150-156.
- Fujii T., Yokoyama E., Inoue K. and Sakurai H.** (1990) The sites of electron donation of PS I to methyl viologen. *BBA,* 1015, 41-48.
- Gawronski, S.W., Suita, M., Sugiura, M.** (1992) Mutation of PsbA gene in herbicide resistant population of *Erigeron canadensis*. In: *Research in Photosynthesis.* 405-407
- Goloubinoff, P., Edelman, M., Hallick, R.B.** (1984) Chloroplast-coded atrazine resistance in *Solanum nigrum*: PsbA loci from susceptible and resistant biotypes are isogenic except for a single codon change. *Nucl. Acids Res.* 12:9489-9496
- Greer D.H. Laing W.A. and Wolley D.J.** (1993) The effect of chloramphenicol on photoinhibition of photosynthesis and its recovery in intact kiwifruit leaves AJPP, 20,33-43.
- Gressel, J.** (1985) Herbicide tolerance and resistance; Alteration of site of activity. In: *Weed Physiology.* II. 159-189
- Guenther J.E. and Melis A.** (1990) the physiological significance of PS II heterogeneity in chloroplast. *Phot. Res.* 23, 105-109.
- Hager, A., Holocher, K.** (1994) Localization of the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light-dependent) pH decrease. *Planta* 192: 581-589.
- Hart, J.J., and Stemler, A.** (1990) High light-induced reduction and low light-enhanced recovery of photon yield in triazine-resistant *Brassica napus* L. *Plant Physiol.* 94: 1301-1307
- Harper D.B. and Harvey B.M.R.** (Mechanism of paraquat tolerance in perennial ryegrass II. Role of superoxid dismutase, catalase and peroxidase. *Plant Cell Env.* 1, 211-215.
- Harvey B.M.R., Muldoon J. and Harper D.B.** (1987) Mechanism of paraquat tolerance in perennial ryegrass I. Uptake, metabolism and translocation of paraquat. *Plant Cell Env.* 1, 203-209.
- 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. Experimental Botany.* 40, 217: 849-854



- Havaux, M.,** Gruszecki, W.I. (1993) Heat- and Light-induced Chlorophyll a Fluorescence Changes in Potato Leaves Containing High Or Low Levels of the Carotenoid Zeaxanthin: Indications of a Regulatory Effect of Zeaxanthin on Thylakoid Membrane Fluidity. *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 58, No. 4, pp. 607-614.
- Havaux, M.,** F. Tardy (1996) Temperature-dependent adjustment of the thermal stability of photosystem II in vivo: possible involvement of xanthophyll-cycle pigments. *Planta* 198: 324-333.
- Hermann G.,** Thiel, A. and Böger P. (1984) Herbicide-binding protein, binding sites and electron-transport activity: Quantitative relations. *Z. Naturforsch.* 39c, 430-433.
- Hideg É.,** Kobayasi M. and Inaba H. (1991) The far red induced slow component of delayed light from chloroplasts is emitted from PS II. Evidence from emission spectroscopy. *Phot. Res.* 29, 107-112.
- Hideg É** and Vass I (1993) The 75°C thermoluminescence band of green tissues: Chemiluminescence from membrane-chlorophyll interaction. *Photochem. Photobiol.* 58, 280-283.
- Hirschberg, J.,** McIntosh, L. (1983) Molecular basis of herbicide resistance in *Amaranthus hybridus*. *Sci.* 224:1346-1348
- Holt, J.S.,** Stemler, A.J., Radosevich, S.R. (1981) Differential light responses of photosynthesis by triazine-resistant and triazine-susceptible *Senecio vulgaris* biotypes. *Plant Physiology.* 67: 744-748
- Holt, J.S.,** Radosevich, S.R. and Stemler, A.J.(1983) Differential efficiency of photosynthetic oxygen evolution in flashing light in triazine-resistant and triazine-susceptible biotypes of *Senecio vulgaris*. *BBA*, 722, 245-255.
- Holt, J.S.** and LeBaron H.M. (1990) Significance and distribution of herbicide resistance. *Weed Techn.* 4, 141-149.
- Horton, P.** and Hauge A. (1988) Studied on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts. IV. Resolution of non-photochemical quenching. *BBA*, 932, 107-115.
- Horton, P.,** Ruban, A.V., Rees, D., Pascal, A.A., Noctor, G., Young, A.J. (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, A.V. (1992) Regulation of photosystem II. *Photosynth. Res.* 34: 375-385.
- Imai Y.** and Kuwatsuka S. (1989) Characteristic of paraquat-degrading microbes. *J. Pest Sci.* 14, 475-480.
- Inoue Y.** and Shibata (1977) Thermoluminescence bands of chloroplast as characterized by flash excitation. In: Proc fourth Int Congr. on Photosynthesis, eds. Hall D.O., Coombs J and Goodwin T.W. pp. 211-221.
- Inoue Y.** (1981) Charging of the A band of thermoluminescence dependent on the S3-state in isolated chloroplast. *BBA*. 634, 309-320.
- Inoue Y.** (1996) Photosynthetic thermoluminescence as a simple probe of PS II electron transport. In: biophysical techniques in Photosynthesis. eds. Ames and Hoff pp. 93-107.
- Ireland, C.R.,** Telfer, A., Covello, P.S., Baker, N.R., Barber, J. (1988) Molecular basis of herbicide resistance in *Amaranthus hybridus*. *Science.* 222: 1346-1349
- Jansen M. A.K.,** Hobé J.H. Wesselius J.C. and van Rensen J.J.S. (1986) Comparison of photosynthetic activity and growth performance in triazine-resistant and susceptible biotypes of *Chenopodium album*. *Physiol Vég.* 24, 475-484.
- Jansen M.A.K.,** Shaaltiel Y., Kazzes D., Canaani O., Malkin S. and Gressel J. 1989 Increased tolerance to photoinhibition light in paraquat-resistant *Conyza bonariensis* measured by photoacoustic spectroscopy and CO<sub>2</sub> -fixation. *Plant Physiol* 91, 1174-1178.



- Joliot P.** and Kok B. (1975) Oxygen evolution in photosynthesis. In: Bioenergetics of photosynthesis. ed. Govindjee. pp. 387-412.
- Joliot P.**, Barbieri G. and Chabaud R. (1969) Une nouveau modčle des centres photosynthetique du systčme II. Photochem. Photobiol. 10, 309-329.
- Jonhson G.N.**, Young A.J., Scholes J.D. and Horton P. (1993) the dissipation of excess excitation energy in Brithish plant species. Plant Cell Env. 16, 673-679.
- Kautsky H.** and Hirsch A. (1931) Neue versuche zur Kohlensaureassimilation. Naturwissenschaften, 48, 964.
- Kok B.**, Forbush B. and McGloin M (1970) Cooperation of charges in photosynthetic oxigen evolution I. A linear four-step. mechanism. Photochem. Photobiol. 11, 457-475.
- Krause, G.H.**, Gerhardt V. and Wachtveitl J. (1987) Temperature dependence of DF-kinetics and PQ-conductivity. In Progress in photosynthetic research II. ed. Biggins J. pp. 505-508.
- Krause, G.H.** (1988) Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanism. Phys. Plantarum. (74, 566-574.
- Krause, G.H.**, Weis, E. (1991) Clorophyll fluorescence and photosynthetic the basic. Annu Rev. Plant Mol. Biol. 42:313-349.
- Krieger, A.**, Weis, E. (1992) Energy-dependent quenching of chlorophyll-a-fluorescence: The involvement of proton-calcium exchange at Photosystem 2. Photosynthetica 27: 89-98.
- Krieger, A.**, Weis, E. (1993) The role of calcium in pH-dependent control of Photosystem II. Photosynth. Res. 37: 117-130.
- Kunert K.J.** and Dodge A.D. (1989) herbicide-induced radical damage and antioxidant systems. In: Target sites of herbicide action. eds. Böger P. and Sandmann G. pp. 45-63.
- Laskay G.** (1986) A fotoszintetikus apparátus szerveződése módosított kloroplasztisz membránokban. Kandidátusi értekezés. JATE, Biofizika Tanszék.
- LeBaron H.M.** and McFarland J. (1990) Herbicide resistance in weed and crops: An overview and prognosis. In Managing resistance to agrochemicals: from fundamental research to practical strategies. Eds. Green, LeBaron, Moberg . pp.336-352.
- LeBaron H.M.** (1991) Distribution and seriousness of herbicide-resistant weed infestation worldwide. In: Herbicide resistnace in weed and crops. ed Caseley, Cussans and Atkin, pp. 27-43.
- Lehoczki, E.**, Laskay, G., Pölös, E. and Mikulás J. (1984) Resistance to triazine-herbicides in horseweed (*Conyza canadensis*) Weed Sci. 32, 669-674.
- Lehoczki, E.**, Pölös, E., Laskay, G., Farkas, T. (1985) Chemical compositions and physical states of chloroplast lipids related to atrazine resistance in *Conyza canadensis L.*. *Plant sci.*, 42:19-24
- Lehoczki E.**, Laskay G., Gaál I, and Szigeti Z. (1992) Mode of the action of paraquat in leaves of paraquat-resistant *Conyza canandensis*. Plant Cell and Env. 15, 531-539.
- Leigh R.A.** and Jones R.G.W. (1986) Cellular compartmentation in plant nutrition: the selective cytoplasm and the promiscuos vacuoles. In: Advance in Plant Nutrition. ed. tinker E.B. and Lauchli A. Vol II, pp. 249-279.
- Leitsch J.**, Schnettger B., Crischley C. and Krause G.H. (1994) Two mechanism of recovery from photoinhibition in vivo: reactivation of PS II related and unrelated to D1-protein turnover. Planta 194, 15-21.
- Lemoine, Y.**, Dubacq, J.P., Zabulon, G., Ducruet, J.M. (1986) Organization of the photosynthetic apparatus from triazine-resistant and -susceptible biotypes of several plant species. *Can. J. Bot.* 64:2999-3007
- Lichtenthaler H.K.**, Buschmann C. Rindle U. and Schmusk G. (1986) Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology. Rad. Env. Biophys. 25, 297-308.
- Lichtenthaler H.K.** (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranres. Methods in enzimology. 148, 350-382.



- Lichtenthaler H.K.** and Rindler U. (1988) Chlorophyll fluorescence signature as vitality indicator in forest decline research. In: Application of chlorophyll fluorescence. ed. Lichtenthaler H.K. pp. 143-149.
- Lichtenthaler H.K.** and Schindler C. (1992) Studies on the photoprotective function of zeaxanthin at high light conditions. In: Research in Photosynthesis. IV. ed. Murata N. pp. 517-520.
- Liebler D.C.** and Kennedy T.A. (1992) Methods in Enzymol. 213, 472-479.
- Melis A.** (1991) Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. BBA, 1058, 87-106.
- Michiels** and Remacle (1988) Use of the inhibition of enzymatic antioxidant system in order to evaluate their physiological importance. Eur. J. Biochem. 177, 435-441.
- Miranda T.** and Ducruet J.M. (1995a) Effects of dark and light-induced proton gradients in thylakoids on the Q and B thermoluminescence bands. Phot. Res. 43, 251-262.
- Miranda T.** and Ducruet J.M. (1995b) Characterization of the chlorophyll thermoluminescence afterglow in dark-adapted or far red illuminated plant leaves. PPB, 33, 689-699.
- Misra A.N.,** Ramaswamy N.K. and Desai T.S. (1997) Thermoluminescence studies on the photoinhibition of photos leaf discs at chilling, room and high temperature. J. Photochem. Photobiol. b. Biol. 38, 164-168.
- Nakamoto H.,** Sunblad L.G. Garderstrom P. and Sundbom E. (1988) Far red stimulated luminescence from barley protoplasts. Plant Sci. 55, 1-7.
- Normann M.A.,** Fuerst E.P., Smeda R.J. and Vaughn K.C. (1993) Evaluation of paraquat resistance mechanism in Conyza. Pest. Biochem. Physiol. 46, 236-249.
- Okada K.,** Satoh K. and Katoh S. (1991) Chloramphenicol is an inhibitor of photosynthesis FEBS Lett. 295, 155-158.
- Ort, D.R.,** Ahrens, W.H., Martin, B., Stoller, E. (1983) Comparison of photosynthetic performance in triazine-resistant and -susceptible biotypes of *Amaranthus hybridus*. *Plant Physiol.* 72: 925-930
- Owens T.G.,** Sheve A.P. and Albrecht A.C. 1992 Dynamics and mechanism of singlet energy transfer between carotenoids and chlorophylls: light harvesting and non-photochemical fluorescence quenching. In *Research in Photosynthesis 1*, Murata N. ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 171-178.
- Owens T.G.** 1994 Excitation energy transfer between chlorophylls and carotenoids. A proposed molecular mechanism for non-photochemical quenching. In *Photoinhibition of Photosynthesis* Baker N.R. and Bowyer J.R. ed., Bios Scientific Publishers, Oxford, 95-107.
- Ögren E.** and Baker N.R. (1985) Evaluation of a technique for the measurement of chlorophyll fluorescence from leaves exposed to continuous white light. *Plant Cell Env.* 8, 539-547.
- Öquist G.,** Chow W.S. and Anderson J.M. (1992) Photoinhibition of photosynthesis represents a mechanism for the long-term regulation of PS II. *Planta*, 186, 450-460.
- Park Y.,** Chow W.S. and Anderson J.M. (1995) Light inactivation of functional PS II in leaves of peas grown in moderate light depends on photon exposure. *Planta*, 196, 401-411.
- Pfeffer P.R.,** Tu S.I. Gerasimowich W.V. and Boswell R.T. (1987) Role of the vacuole metal ion trapping as studied by in vivo <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy. In: *Plant Vacuoles*, ed. Martin B. Plenum Press, 349-359.
- Pfister, K.,** Arntzen, C.J. (1979) The mode of action of Photosystem II-specific inhibitor in herbicide-resistant weed biotypes. *Z. Naturforschung.* 34c:996-1009
- Pfündel E.** and Bilger W. (1994) Regulation and possible function of the violaxanthin cycle. *Phot Res.* 42, 89-109.



- Piscotti R.**, Keller F. Bagni N. and Matile P. (1988) Transport and subcellular localisation of polyamines in carrot protoplast and vacuoles. *Plant Physiol.* 87, 514-518.
- Powles S.P.** (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 15-44.
- Pölös E.**, Mikulás J., Szigeti Z. Matkovics B., Hai D.Q., Párducz Á. and Lehoczki E. (1988) Paraquat and atrazine co-resistance in *Conyza canadensis*. *Pest Biochem. and Physiol.* 30. 142-154.
- Prasil O.**, Adir N. and Ohad I. 1992 Dynamics of photosystem II: mechanism of photoinhibition and recovery processes. In *The Photosystems: structure, function and molecular biology*, Barber J. ed., Elsevier, Amsterdam, 295-348.
- Preston C.**, Holtum J.A.M. and Powles S.B. 1991 Resistance to the herbicide paraquat and increased tolerance to photoinhibition are not correlated in several weed species. *Plant Physiol.* 96, 314-318.
- Preston C.**, Holtum J.A.M. and Powles S.(1992) Do polyamines contribute to paraquat resistance in *Hordeum glaucum*? In *Research in Photosynthesis*, ed. Murata N., Vol III. pp. 571-574.
- Preston C.**, Holtum J.A.M. and Powles S.(1992) On the mechanism of resistance to paraquat in *Hordeum glaucum* and *H. leporinum*. Delayed inhibition of photosynthetic O<sub>2</sub> evolution after paraquat application. *Plant Physiol.* 100, 630-636.
- Preston C.**, Balachandran S. and Powles S.(1994) Mechanism of resistance to bipyridyl herbicides in *Arctotheca calendula*. *Plant Cell Env.*
- Preston C.**(1994) Resistance to photosystem I disrupting herbicides. In *Herbicide resistance in plants*. Eds. Powles S.B. and Holtum J.A.M., pp. 61-82.
- Quick W.P.** and Stitt M. (1989) An examination of factors contribution to non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in barley leaves. *BBA*, 977, 287-296.
- Ricroch, A.**, Mousseau, M., Darmency, H., Pernes, J. (1987) Comparison of Triazine-resistant and -susceptible Cultivated *Setaria italica*: Growth and Photosynthetic Capacity. *Plant Physiol. Biochem.* 25::29-34
- Rienits K.G.**, Hardt H. and Avron M. (1974) Energy-dependent reverse electron flow in chloroplast. *Eur. J. Biochem.* 43, 291-298.
- Ruban, A.V.**, Rees, A.A., Pascal, A.A., Horton, P. (1992) Mechanism of DpH-dependent dissipation of absorbed excitation energy by photosynthetic membranes. II. The relationship between LHClI aggregation in vitro and qE in isolated thylakoids. *Biochim. Biophys. Acta* 1102: 39-44.
- Ruban, A.V.**, Horton, P. (1992) Mechanism of DpH-dependent dissipation of absorbed excitation energy by photosynthetic membranes. I. Spectroscopic analysis of isolated light-harvesting complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1102: 30-38.
- Rubin A.B.** and Venediktov P.S. (1969) Storage of the light energy by photosynthesizing organisms at low temperature. *Biofizika*, 14. 105-109.
- Rutherford W.A.**, Crofts A.R. and Inoue Y. (1984) Thermoluminescence as a probe of photosystem II photochemistry; the origin of the flash-induced glow peaks. *BBA* 682, 457-465.
- Rutherford W.A.**, Crofts A.R. and Inoue Y. (1984) Charge accumulation and photochemistry in leaves studies by thermoluminescence and delayed light emission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1107-1111.
- Rutherford W.A.**, Renger G, Koike H and Inoue Y. (1985) Thermoluminescence as a probe of PS II: The redox and protonation state of secondary acceptor auinone and the O<sub>2</sub> evolving enzyme. *BBA*, 767, 458-556.
- Ryan G.E.** (1970). Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Sci* 18: 614-616, 1970



- Salin M.L.** (1991) Chloroplast and mitochondrial mechanisms for protection against oxygen toxicity. *Free Rad. Res. Comms.* Vols. 12-13, pp. 851-858.
- Schnettger B.**, Cristchley C., Santore U.J., Graf M. and Krause G.H. (1994) relationship between photoinhibition of photosynthesis, D1 protein turnover and chloroplast structure: effects of protein synthesis inhibitors. *Plant, Cell and Env.* 17, 55-64.
- Schmidt W.** and Senger H. (1987) Long-term delayed luminescence in *Scenedemus obliuus*. *BBA*, 890, 15-27.
- Schoefs B.**, Bertrand M. and Y. Lemoine (1995) separation of photosynthetic pigments and their precursors by reversed-phase high-performance liquid chromatography using a photodiode-array detector. *J. Chromatography.* 692, 239-245.
- Schöner S** and Krause G.H. (1990) Protective system against active oxygen species in spinach: Response to cold acclimation in excess light. *Planta* 180, 383-389.
- Schubert H.**, Bernd M.A., Kroon and Matthijs H.C.P. (1994) In vivo manipulation of the xanthophyll cycle and the role of zeaxanthin in the protection against photodamage in the green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Biol. Chem.* 269, 7267-7272.
- Schreiber, U.** (1984) Comparison of ATP-induced and DCMU-induced increases of chlorophyll fluorescence. *BBA*, 767, 80-86.
- Schreiber, U.** (1986) Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer. *Phot. res.* 9, 261-271.
- Schreiber, U.**, and Bilder, W. (1993) Progress in chlorophyll fluorescence research major developments during the past years in retrospect. *Progress in Botany* 54:151-173.
- Schonfeld M.**, Yacobi T., Michael O. and Rubin B. (1987) Triazine resistance without reduced vigour in *Phalaris paradoxa*. *Plant Physiol.* 83, 329-333.
- Schubert H.**, Kroon B.M.A. and Matthijs H.C.P. (1994) In vivo manipulation of the xanthophyll cycle and the role of zeaxanthin in the protection against photodamage in green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Biol. Chem.* 269, 7267-7272.
- Schumaker K.S.** and Sze H. (1986) Calcium transport into the vacuole of oat roots. *J. Biol. Chem.* 261. 12172-12178.
- Shaaltiel Y** and Gressel J. (1986) Multienzyme oxygen radical detoxifying system correlated with paraquat resistance in *Conyza bonariensis*. *Pest Biochem. Physiol.* 26, 22-28.
- Shaaltiel Y** and Gressel J. (1987) Kinetic analysis of resistance to paraquat in *Conyza*. Evidence that paraquat transiently inhibits leaf chloroplast reaction in resistant plants. *Plant Physiol.* 85, 869-871.
- Smith B.M.**, Morissey P.J., Guenther J.E., Nemson J.A., Harrison M.A., Allen J.F. and Melis A. (1990) Response of the photosynthetic apparatus in *Dunaliella salina* (green algae) to irradiance stress. *Plant Physiol.* 93, 1433-1440.
- Stallaert V.M.**, Ducruet J.M., Tavernier E. and Blein J.P. (1995) Lipid peroxidation in tobacco leaves treated with the elicitor cryptogen: evaluation by high-temperature thermoluminescence emission and chlorophyll fluorescence. *BBA*, 1229, 290-295.
- Strasser R.J.**, Schwarz B. and Bucher J. (1987) Simultane messung der chlorophyll fluoreszenz kinetik bei verschiedenen vellenlagen als rasches verfahren zur frühdiagnose von immissionsbelastungen an Waldbaumen. Ozonwirkung auf buchen und pappeln. *Europ. J Forest Pathology.* 17, 149-157.
- Sundblad L.G.** (1988) Dark reduction of QA in intact barley leaves as an effect of lowered CO<sub>2</sub> concentration monitored by chlorophyll a luminescence and chlorophyll a Fo dark fluorescence. *BBA*, 936, 429-434.
- Sundby, C.**, Chow, W.S., Anderson, J.M. (1993a) Effects on photosystem II Function, Photoinhibition, and Plant Performance of the Spontaneous Mutation of Serine-264 in the Photosystem II Reaction Center D<sub>1</sub> Protein in Triazine-Resistant *Brassica napus* L. *Plant Physiol.* 103: 105-113.



- Sundby, C., McCaffery, S., Chow, W.S., Anderson, J.M.** (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 N Murata, ed, Research in Photosynthesis, Vol. 4. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp. 443-447.
- Tanaka Y., Chisaka H. Saka H.** (1986) Movement of paraquat in resistant and susceptible biotypes of *Erigeron philadelphicus* and *E. canadensis*. *Physiol. Plant.* 66, 605-608.
- Thayer S.S.** and Björkmann O. (1990) Leaf xanthophyll content and composition in sun and shade plants determined by HPLC. *Phot Res.* 23, 331-343.
- Thiele A.** and Krause G.H. (1994) Xanthophyll cycle and thermal energy dissipation in PS II: Relationship between zeaxanthin formation, energy-dependent fluorescence quenching and photoinhibition. (*J. Plant Physiol.* 144, 324-332.
- Turcsányi E., É. Darkó, G. Borbély and E. Lehoczki** (1998) The activity of oxiradical-detoxifying enzymes is not correlated with paraquat resistance in *Conyza canadensis* (L) Cronq. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, (in press).
- Tyystjärvi E. Ali-Yrkkö K., Kettunen R. and Aro E.M.** (1992) Slow degradation of the D1 protein is related to the susceptibility of low-light-grown pumpkin plants to photoinhibition. *Plant Physiol.* 100, 1310-1317.
- van Kooten, O., Snel, J.F.H.** (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth. Res.* 25: 147-150
- van Oorschot, J.L.S., van Leuwen, P.H.** (1984) Comparison of the photosynthetic capacity between intact leaves of triazine-resistant and susceptible biotypes of six weed species. *Z. Naturforschung.* 39c: 440-442
- Van Wijk K.J.** and van Hasselt P.R. (1993): Photoinhibition of photosystem II in vivo is preceded by down-regulation through light-induced acidification of the lumen: Consequences for the mechanism of photoinhibition in vivo. *Planta*, 189. 359-368.
- Váradi, G., Darkó, E., 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., Darkó É, Pölös E, Szigeti Z. and Lehoczki E.** (1995) Xanthophyll cycle pattern and *in vivo* photoinhibition in atrazine- and paraquat-resistant, paraquat-atrazine co-resistant and susceptible biotypes of *Conyza canadensis*. (Proceedings of the International Symposium on Weed and Crop Resistance to Herbicides.)
- Vass I** and Demeter S. (1982) Classification of PS II inhibitors by thermodynamic characterization of the thermoluminescence of inhibitor-treated chloroplast. *BBA*, 682, 496-499.
- Vass I** and Inoue Y. (1992) Thermoluminescence in the study of PS II. In *The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology*. Topics in Photosynthesis. Ed. Barber J. Vol 11. pp. 259-294.
- Vass I** and Govindjee (1996) Thermoluminescence from the photosynthetic apparatus. *Phot. Res.* 48, 117-126
- Vavilin D.V., Matorin D.N., Katara R.S., Bantina A.L. and Venediktov P.S.** (1991) *Biol. Membr.* 5, 89-98.
- von Caemmerer S.** and Farguhar G.D. 1981 Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153, 376-387.
- Walter R.G.** and Horton P. (1991) Resolution of components of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in barley leaves. *Phot. Res.* 27, 121-133.
- Warwick, S.I.** (1980) Differential growth between and within triazine-resistant and triazine-susceptible biotypes of *Senecio vulgaris* L. *Weed research*, 20:299-303



**Winter K.** and Königer M. (1989) DTT, an inhibitor of violaxanthin de-epoxidation, increases the susceptibility of leaves of *Nerium oleander*. to photoinhibition of photosynthesis. *Planta* 180, 24-31.



## Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindenekelőtt Dr. Lehoczki Endrének, témavezetőmnek, a 6 éven keresztül együtt töltött közös kutatómunkáért, mindazért a szakmai segítségért amit a munkám során Tőle kaptam.

Köszönöm Y. Lemoine-nek, a lille-i egyetem professzorának a lehetőséget, hogy 1 éves franciaországi ösztöndíj segítségével laboratóriumában dolgozhattam és mindazt a segítséget, amit a pigmentanalízis terén nyújtott. Ugyanezért hálával tartozom B. Schoefs-nak is.

Köszönettel tartozom Dr. JM. Ducruet-nek a termolumineszcencia vizsgálatok rejtelseibe való bevezetésért és számos igen hasznos szakmai tanácsáért.

Továbbá köszönettel tartozok mindazoknak akik akár az egyetemi éveim alatt, akár a későbbiekben (PhD. hallgatóként) tanításukkal hozzájárultak szakmai ismereteim gyarapodásához.

Tudományos közlemények

1. Gy. Váradi, **É. Darkó**, E. Pölös, Z. Szigeti and E. Lehoczki (1994): Xanthophyll cycle patterns and *in vivo* photoinhibition in herbicide-resistant biotypes of *Conyza canadensis* J. Plant Physiology 144., 669-674.
2. Z. Szigeti, **É. Darkó**, E. Nagy and E. Lehoczki (1994): Diquat resistance of different paraquat-resistant *Conyza canadensis* J. Plant Physiology 144., 686-690.
3. Z. Szigeti, I. Rác, **É. Darkó**, D. Lásztity and E. Lehoczki (1996): Are either SOD and catalase or the polyamines involved in the paraquat resistance of *Conyza canadensis*. J. Environ. Sci. Health. B. 31, 310-315.
4. **Éva Darkó**, Gyula Váradi, Sándor Dulai and Endre Lehoczki (1996): Atrazin-resistant biotypes of *Conyza canadensis* have altered fluorescence quenching and xanthophyll cycle pattern. Plant Physiol. Biochem., 34., 843-852.
5. E. Turcsányi, E. Lehoczki, **É. Darkó**, Gy. Surányi, G. Borbély (1993) Superoxid dismutase activity in paraquat resistant *Conyza canadensis* plants in: Frontiers of reactive oxygen species in biology and medicine. ed. K. Asada, T. Yoshikawa, 1994 Elsevier Science B.V. pp. 123-124.
6. **É. Darkó**, Gy. Váradi, A. Hargitai, E. Nagy and E. Lehoczki (1995) Comparison of photosensitivity of the photosynthetic apparatus in different light adapted atrazine-resistant and susceptible biotypes from *Conyza canadensis* (L.) Cronq. In: Photosynthesis from light to Biosphere ed. P Mathis, Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London IV., pp. 191-194.
7. Gy. Váradi, **É. Darkó**, E. Pölös, Z. Szigeti and E. Lehoczki (1996) Xanthophyll cycle pattern and *in vivo* photoinhibition in atrazine- and paraquat-resistant, paraquat-atrazine co-resistant and susceptible biotypes of *Conyza canadensis*. In. Proc. of the Internat. Symp. on Weed and Crop Resistance to Herbicides. Ed. De Prado R., pp.121-123.
8. E. Turcsányi, **É. Darkó**, G. Borbély and E. Lehoczki (1998) The activity of oxiradical-detoxifying enzymes is not correlated with paraquat resistance in *Conyza canadensis* (L) Cronq. Pesticide Biochemistry and Physiology, (in press).
9. Anne Chreach, **É. Darkó**, Y. Lemoine (1997) Effects of low temperature (6°C) on susceptible and atrazine resistant biotypes of *Chenopodium album*. Plant Sciences 1997, spec. issue, pp. 354-355.
10. Lásztity D., Rác I., **Darkó É.**, Hidvégi E. and Szigeti Z. (1998) Paraquat resistance of horseweed (*Erigeron canadensis*) is not caused by polyamines. Plant Cell and Environ. (submitted).



## Poszterek

1. Gy. Váradi, **É. Darkó**, E. Pölös and E. Lehoczki: Xanthophyll cycle pattern and *in vivo* photoinhibition in atrazine-resistant biotypes of *Conyza canadensis* and *Chenopodium album*  
9th Congress of the Federation of European Societies Of Plant Physiology, Brno, Czech Republic, 3-8 July 1994
2. **É. Darkó**, E. Lehoczki and Z. Szigeti: Nuclear coded protein can be involved in the mechanism of paraquat resistance  
9th Congress of the Federation of European Societies Of Plant Physiology, Brno, Czech Republic, 3-8 July 1994
3. Z. Szigeti, **É. Darkó**, I. Rácz, D. Lásztity, E. Lehoczki: Possible role of polyamines and nuclear coded protein in the mechanism of paraquat resistance in *Conyza canadensis*  
Botanikertagung 1994, Bayreuth, 11-19 September 1994
4. **Darkó É.**, Váradi Gyula, Dulai Sándor, Nagy Erika, Szigeti Zoltán, Lehoczki Endre: Photoinhibition, atrazine-resistance and xanthophyll cycle in *Conyza canadensis*  
Biostress '94 - Bioexpo '96, the Hungarian Society for Plant Physiology, Szeged, Hungary, 11-12 July 1994
5. **É. Darkó**, Gy. Váradi, A. Hargitai, E. Nagy and E. Lehoczki: Comparison of photosensitivity of the photosynthetic apparatus in different light adapted atrazine-resistant and susceptible biotypes from *Conyza canadensis* (L.) Cronq.  
Xth International Photosynthesis Congress , Montpellier, France, 20-25 August 1995
6. Z. Szigeti, **É. Darkó**, G. Szalai, I. Rácz, D. Lásztity and E. Lehoczki (1996) Paraquat resistance and polyamin content in *Conyza canadensis* grown and treated at different temperatures. Plant Physiology and Biochemistry, Special issue, 303. S20-24. (Abst.)
7. **É. Darkó**, A. Chreach, JM. Ducruet and Y. Lemoine (1997). Etudes comparee de deux biotypes de *Chenopodium album*, sensible et resistant á l'atrazine. Effets de la culture á faible temperature (6°C). Le Colloque de Photosynthese, Institute Curie, Paris, 23-24 aout, 1997.