

Tolerance of desiccation stress in *Sphagnum denticulatum* Brid. (Sphagnaceae, Bryophyta) from aquatic and terrestrial habitats

Tolerancja stresu suszy u mchu torfowca *Sphagnum denticulatum* Brid. (Sphagnaceae, Bryophyta) pochodzącego z siedlisk wodnych i lądowych

Autor rozprawy: mgr Katarzyna Winnicka

Streszczenie

W ostatnich latach fragmentacja i wysychanie obszarów podmokłych, w tym także torfowisk, staje się coraz poważniejszym i powszechnym problemem. Planowanie skutecznych strategii ochrony dla tych cennych obszarów wymaga dogłębnego poznania mechanizmów odpowiedzi na wysuszenie u mchu torfowca (*Sphagnum*, *Sphagnaceae*, *Bryophyta*), będącego kluczową rośliną w ekosystemach torfowiskowych. Istnieją jedynie nieliczne i fragmentaryczne badania poświęcone różnym aspektom odpowiedzi na wysuszenie i rehydratację u tych roślin. Celem niniejszej pracy jest ocena biologicznych efektów wysuszenia i rehydratacji u pięciu genotypów reprezentujących dwa ekotypy (wodny i lądowy) mchu torfowca *S. denticulatum*.

Badania przeprowadzono na różnym poziomie organizacji organizmu: ultrastrukturalnym, fizjologicznym oraz molekularnym z wykorzystaniem zestawu metod genotypowych i fenotypowych. W celu porównania cech morfologicznych u roślin kontrolnych reprezentujących ekotyp wodny i lądowy wykonano pomiary wysokości roślin oraz średnicy i upakowania ich główek. W celu oceny zmian w ultrastrukturze komórek *S. denticulatum* na skutek wysuszenia i rehydratacji, komórki (sub)merystematyczne oraz zróżnicowane (hialinowe i fotosyntetyczne) pączka wierzchołkowego łodyżki zostały przeanalizowane przy pomocy transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Pod uwagę wzięte zostały 34 cechy ultrastruktury komórki, które dotyczyły wielkości i kształtu komórek i organelli w komórkach (sub)mersystematycznych oraz wielkości i kształtu komórek zróżnicowanych. W celu oceny zdolności roślin do wznowienia podstawowych procesów metabolicznych po dotkliwym wysuszeniu i rehydratacji przeprowadzono monitoring parametrów fluorescencji chlorofilu (ChlFP) i zawartości barwników fotosyntetycznych (chlorofilu *a* i *b* oraz karotenoidów). Mierzono następujące ChlFP: maksymalna wydajność kwantowa PSII (F_v/F_m), rzeczywista wydajność PSII (Φ_{PSII}), fotochemiczne wygaszanie fluorescencji (*qP*) oraz niefotochemiczne

wygaszanie fluorescencji (NPQ). W celu identyfikacji transkryptów genów ulegających nadekspresji pod wpływem wysuszenia zastosowano metodę cDNA-ALFP (ang. *amplified fragment length polymorphism*) oraz przeprowadzono ilościową analizę ekspresji zidentyfikowanych genów z użyciem metody RT-qPCR. Ponadto zastosowano test porównania tempa substytucji niesynonimicznych do synonimicznych (d_N/d_S), który pozwala wykryć czy określone miejsca nukleotydowe w zidentyfikowanych genach są pod wpływem selekcji pozytywnej.

Materiał roślinny do badań stanowiło pięć genotypów pochodzących ze stanowisk wodnych i lądowych, które powielono w wyniku wegetatywnego rozmnażania. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono na roślinach długotrwanie hodowanych w ujednoliconych warunkach fitotronowych. Rośliny były wysuszane przez 72–96 godziny i następnie rehydratowane przez 7–30 dni.

Rośliny były zdolne do częściowego przywrócenia kontrolnych wartości badanych parametrów po dotkliwym wysuszeniu. Nawet po długotrwałej hodowli w ujednoliconych warunkach fitotronowych rośliny wykazywały pewne cechy zależne od ekotypu. Na przykład w warunkach kontrolnych rośliny reprezentujące dwa ekotypy istotnie różniły się w badanych cechach morfologicznych. Ponadto rośliny reprezentujące ekotyp wodny wykazywały przystosowanie do środowisk zacienionych (np. niższe F_0 i Chl *a/b*), co może mieć związek z warunkami świetlnymi ich natywnego środowiska. W komórkach wszystkich roślin wysuszenie powodowało silne uszkodzenia ultrastrukturalne (np. dezorganizacja błon, obkurczenie protoplastu, nabrzmienie chloroplastów) oraz całkowity zanik aktywności fotosyntetycznej (widoczny we wszystkich ChlFP). Fotoinhibicja w stanie wysuszonym była większa u roślin lądowych w porównaniu do roślin wodnych, co może wskazywać na większe uszkodzenia białek i barwników wchodzących w skład fotosystemów lub na lepsze mechanizmy fotoprotekcji u tych roślin. Po rehydratacji (7 dni) wszystkie komórki (sub)merystematyczne roślin reprezentujących ekotyp wodny były martwe, natomiast u dwóch (z trzech) genotypów lądowych komórki (sub)merystematyczne w 15 z 23 przebadanych cech nie różniły się od kontroli. Po rehydratacji obserwowano powolne wznawianie reakcji fotochemicznej. Odtworzenie aktywności fotochemicznej aparatu fotosyntetycznego, wyrażonej jako maksymalna wydajność kwantowa PSII (F_v/F_m), było bardziej kompletne u roślin lądowych w porównaniu do roślin wodnych. Parametr NPQ pozostał silnie obniżony mimo długotrwałej rehydratacji roślin, co może świadczyć m.in. o trwałej degradacji enzymów zaangażowanych w mechanizm niefotochemicznego rozpraszania energii. Krótkotrwała rehydratacja (7 dni) spowodowała gwałtowną degradację puli barwników fotosyntetycznych,

która została tylko częściowo odtworzona w czasie długotrwałej rehydratacji (30 dni) u obu ekotypów.

Na podstawie analizy cDNA-AFLP zidentyfikowano 38 genów, z których 21 z powodzeniem włączono do analizy RT-qPCR. Geny te pełnią różnorodne funkcje molekularne takie jak wiązanie białek i nukleotydów, aktywność katalityczna, aktywność transporterowa czy regulacja aktywności enzymów. Niektóre z nich mogą mieć udział w kształtowaniu odpowiedzi na wysuszenie u *S. denticulatum*, ponieważ ilościowa analiza ekspresji potwierdziła, że 9 z 21 badanych genów ulegało silnej nadekspresji (4,6–150-krotny wzrost ekspresji) podczas wysuszania roślin reprezentujących ekotyp wodny. Na podstawie testu d_N/d_S wykazano, że kilka miejsc nukleotydowych jest pod wpływem selekcji naturalnej.

Badane rośliny wykazywały zróżnicowany stopień tolerancji na wysuszenie. Rośliny pochodzące z siedlisk lądowych doświadczyły mniejszego stresu podczas wysuszania i po rehydratacji wykazywały większą zdolność do powrotu do prawidłowego funkcjonowania w porównaniu do roślin reprezentujących ekotyp wodny. Powodem obserwowanych różnic pomiędzy ekotypami może być zróżnicowany stopień plastyczności cech u poszczególnych osobników lub ich lokalna adaptacja do natywnych warunków środowiska. Wyniki wskazują, że czynnik genetyczny i środowiskowy powinny być brane pod uwagę przy planowaniu zabiegów ochronnych dla mchów torfowców. Udowodniono, że *S. denticulatum* jest w stanie przetrwać głęboki stres.

Dzięki niniejszym badaniom poznano złożoną odpowiedź mchów torfowców na wysuszenie w kontekście ich zróżnicowania genotypowego i ekologicznego. Praca jest nowatorska pod względem syntetycznego podejścia do problemu. Badania pozwoliły na optymalizację i ocenę zastosowanych metod w odniesieniu do torfowców. Po raz pierwszy analizowano zmiany ekspresji genów u mchu torfowca w warunkach wysuszania oraz wskazano użyteczne geny referencyjne dla metody RT-qPCR. Praca może stanowić podstawę przy planowaniu dalszych eksperymentów u *Sphagnum* i innych blisko spokrewnionych mszaków. Dalsze badania powinny obejmować analizę molekularną wielu roślin reprezentujących różne populacje, aby wskazać wewnątrz- i międzypopulacyjne zróżnicowanie w odpowiedzi *S. denticulatum* na wysuszenie oraz sformułować wnioski na temat mechanizmów adaptacji *Sphagnum* do środowiska.

Abstract

In recent years, the progressive fragmentation and drying of peatlands and other wetlands has become a widespread and serious problem. Successful conservation strategies to preserve those valuable areas require a deep understanding of the response mechanisms to desiccation of peat mosses (*Sphagnum*, *Sphagnaceae*, *Bryophyta*), which are the key species in peatland ecosystems. Only scant data on various aspects of the response to desiccation and rehydration of those plants are available. This study has assessed the biological effects of desiccation and rehydration in five genotypes belonging to two ecotypes (aquatic and terrestrial) of peat moss *S. denticulatum*.

This study has employed a broad methodology that considers various levels of biological organization: ultrastructural, physiological, and molecular. To compare the morphological characters of the control plants representing aquatic and terrestrial ecotypes, measurements of the plants' height, capitulum diameter, and capitulum compactness were performed. To evaluate the changes in cell ultrastructure of *S. denticulatum* triggered by desiccation and rehydration, the (sub)meristematic and differentiated (hyaline and photosynthetic) cells of the apical bud of the stem were analyzed using transmission electron microscopy. Thirty-four characters of cell ultrastructure connected to the size and shape of cells and organelles in (sub)meristematic cells were analyzed, along with the size and shape of differentiated cells. Chlorophyll fluorescence parameters (ChlFP) and photosynthetic pigment content (chlorophyll *a* and *b* and carotenoids) were monitored to evaluate the ability of plants to restore the basic metabolic processes after severe desiccation and subsequent rehydration. The following ChlFP were measured: the maximum quantum yield of PSII (F_v/F_m), the actual quantum yield of PSII (Φ_{PSII}), photochemical quenching (qP), and nonphotochemical quenching (NPQ). Complementary DNA amplified fragment length polymorphism (cDNA-AFLP) was used to identify transcripts that are upregulated by desiccation, and a quantitative analysis of the identified transcripts was performed using the reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR) technique. Moreover, a comparison of nonsynonymous to synonymous substitutions rate (d_N/d_S) was conducted to detect the influence of selection on codon sites in the identified genes.

The plant material for the study was five genotypes of *S. denticulatum*, originating from aquatic and terrestrial sites that were vegetatively propagated. All the experiments were conducted using plants cultivated long term in common phytotron conditions. The plants were desiccated for 72–96 hours and subsequently rehydrated for 7–30 days.

After severe desiccation, the plants were able to partially recover to the control values of the studied parameters. Even after long-term cultivation in the homogeneous phytotron conditions, the plants showed some ecotype-specific characters. For example, in control conditions, the plants of the two ecotypes diverged in studied morphological characters. Moreover, the plants in the aquatic ecotype showed shade adaptation (e.g., lower F_0 and Chl *a/b*), which might correspond with the light conditions in their native environment. In all plants, desiccation caused severe ultrastructural damage and complete loss of photosynthetic activity (the latter revealed by all ChlFP). The photoinhibition was greater in terrestrial plants compared to aquatic plants, which might indicate more severe damage to the proteins and pigments of their photosystems or better photoprotective mechanisms in those plants. After rehydration (7 days), all (sub)meristematic cells of the plants in the aquatic ecotype were dead (with disorganized membranes, protoplast shrinkage, and swollen chloroplasts), whereas in two (out of three) terrestrial genotypes, the (sub)meristematic cells were identical to control cells in 15 out of 23 studied characters. After rehydration, the photochemical reaction was slowly restored. The reactivation of photosynthetic apparatus functions, expressed as maximal quantum efficiency of PSII (F_v/F_m), was closer to being complete in terrestrial plants compared to in aquatic plants. The NPQ parameter stayed strongly inhibited despite long-term rehydration of the plants, which might be due to the permanent degradation of enzymes involved in the nonphotochemical quenching mechanism. Short-term rehydration (7 days) caused rapid degradation of the photosynthetic pigment pool, which was only partially resynthesized during long-term rehydration (30 days) in both ecotypes.

In the cDNA-AFLP analysis, 38 genes were successfully identified, 21 of which were included later in the RT-qPCR analysis. The genes have various molecular functions such as proteins and nucleotides binding, catalytic activity, transporter activity, and regulatory activity of enzymes. Some of the genes might participate in response to desiccation of *S. denticulatum* because quantitative analysis of gene expression confirmed that nine out of 21 studied genes were highly upregulated (4.5- to 150-fold change) during desiccation in the plants in the aquatic ecotype. Based on the d_N/d_S test, a few codons were established under the influence of (positive) natural selection.

The studied plants showed a differentiated level of tolerance to desiccation. The plants from the terrestrial habitats experienced lower stress during desiccation and showed a higher ability to recover after rehydration compared to the plants in the aquatic ecotype. The basis of the observed differences between ecotypes could be various levels of plasticity in particular individuals or a local adaptation to their native environmental conditions. The results suggest

that genetic and environmental factors should be considered when planning conservation strategies for peat mosses. It was proven here that *S. denticulatum* is able to survive severe stress.

This study has shown the complex response of peat mosses to desiccation in relation to their genotypic and ecological differentiation. The work is novel in terms of its synthetic approach; it optimized and assessed multiple methods for peat mosses. For the first time, changes in gene expression in peat moss under desiccation were analyzed, and the reference genes for the RT-qPCR analysis were described. The present work might serve as a basis for planning further experiments for *Sphagnum* and the closely related bryophyte species. Future studies should include the molecular analysis of many plants representing multiple populations, which might reveal intra- and inter-population variability in *S. denticulatum* response to desiccation and infer the true mechanisms of *Sphagnum* adaptation to the environment.