

Ocena wrażliwości roślin uprawnych na wybrane stresy środowiska przy użyciu metody fluorescencyjnej

Streszczenie

Badano wpływ silnego napromieniowania (PPFD $800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) w temp. 24°C i 4°C , na fluorescencję chlorofilu w liściach ogórka odm. Julian F1, oraz (PPFD $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) w temp. 17°C i 4°C , na fluorescencję chlorofilu w liściach pszenżyta odm. Wanad. Pomiary wykonano przy użyciu fluorymetru typu PAM wyznaczając parametry F_v/F_m , ETR, Rfd i Y. Z analizy zmian wartości parametrów, które nastąpiły pod wpływem czynników stresowych wynika, że rośliny pszenżyta w porównaniu z roślinami ogórka wykazują mniejszą wrażliwość na zwiększone napromieniowanie, szczególnie w warunkach obniżonej temperatury. Badane fragmenty liści poddano restytucji przez 24 h w ciemności i w temperaturze pokojowej, a następnie powtórzono poprzednie pomiary fluorescencji chlorofilu. W procesie restytucji nastąpił znaczny wzrost wartości wszystkich parametrów wyznaczanych dla pszenżyta, natomiast w przypadku ogórka wzrost wartości parametrów był stosunkowo niewielki. Utrwalone zakłócenia reakcji fotosyntezy w liściach chłodowrażliwego ogórka, po silnym napromieniowaniu przy obniżonej temperaturze świadczą o poważnych i nieodwracalnych skutkach stresu świetlnego.

Słowa kluczowe: chłód, fluorescencja chlorofilu, fotoinhibicja, ogórek, pszenżyto, fotosynteza.

Wstęp

Na rośliny uprawne rosnące w warunkach naturalnych oddziałuje szereg czynników stresowych, jak np. niska i wysoka temperatura, deficyt wody, zbyt duże napromieniowanie w zakresie fotosyntetycznie czynnym (PAR; 400 –700 nm), uszkodzenia mechaniczne, zanieczyszczenia gazowe i fitotoksyny. Czynniki te zakłócając wzrost i rozwój roślin wpływają na zmniejszenie plonów. Procesem metabolicznym szczególnie wrażliwym na wiele czynników stresowych jest fotosynteza. Z reguły kilka czynników stresowych działa jednocześnie i mamy do czynienia z ich zespołem, czyli tzw. multistresem [Starck 1998]. Często składnikiem takiego zespołu jest **stres świetlny**, który występuje w przypadku, gdy barwniki fotosyntetyczne absorbują zbyt dużo energii PAR w odniesieniu do możliwości jej przetworzenia na energię chemiczną w procesie fotosyntezy. Stres taki może wystąpić także i przy umiarkowanym napromieniowaniu,

gdy współuczestniczą z nim inne czynniki stresowe, jak np. chłód, susza, antropogeniczne zanieczyszczenia inhibujące fotosyntezę [Kacperska 2002, Skórska 2002, Murkowski 2002a]. Skutkiem stresu świetlnego jest **fotoinhibicja** reakcji fotosyntezy, co przejawia się głównie w destrukcji centrum reakcji II fotosystemu (PS II) oraz spowolnieniu transportu elektronów w obu fotosystemach. W przypadku długotrwałej fotoinhibicji w tkankach może zostać wywołany **stres oksydacyjny**, który przejawia się w inicjacji wolnorodnikowego utleniania lipidów w błonach chloroplastów oraz utleniania barwników fotosyntetycznych. Rośliny posiadają wyspecjalizowane mechanizmy naprawcze, które w procesie **restytucji** mogą w pełni lub w części przywrócić utraconą efektywność reakcji fotosyntezy [Foyer i in. 1994, Lichtenthaler 1996, Murkowski i Skórska 2004]. Zarówno skutki fotoinhibicji jak i zjawiska towarzyszące dezintegracji aparatu fotosyntetycznego znajdują swoje odzwierciedlenie w zmianach wartości parametrów fluorescencji (FL) chlorofilu [Maxwell i Johnson 2000, Murkowski i Skórska 1997, Schreiber i in. 2000].

Metody fluorymetryczne pozwalają szybko i z dużą czułością oceniać zarówno reakcje roślin na zakłócenia procesu fotosyntezy przez czynniki stresowe, jak również skuteczność mechanizmów naprawczych oraz integralną zdolność roślin do utrzymywania homeostazy w niekorzystnych warunkach środowiska [Krause i Somersalo 1989, Lichtenthaler i in. 1986, Murkowski A. 2002b, Schapendonk i in. 1992, Skórska 2002].

Cel badań

Celem badań była ocena i porównanie reakcji aparatu fotosyntetycznego dwóch gatunków roślin na dwa czynniki stresowe, jakimi są chłód oraz silne napromieniowanie. Ogólniejszym celem było wykazanie możliwości i zalet metod fluorescencyjnych zastosowanych w pracach selekcyjnych (hodowla roślin, inżynieria genetyczna i in.) oraz monitoringu ekologicznym.

Materiał i metody

Rośliny ogórka odm. Julian F1 rosły w termoluminostacie na podłożu piaskowym, podlewane pożywką Hoaglanda (50%), przy oświetleniu lampami LRFR 400 [PPFD 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperiod 12 h], w temp. 24/18°C, odpow. dzień/noc, a rośliny pszenżyta odm. Wanad w termoluminostacie przy oświetleniu lampami LRFR 400 [PPFD 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperiod 12 h], w temp. 17/12°C. Do badań pobierano krążki wycięte ze środkowych części drugich liści po 20 dniach ich wzrostu. W każdej serii było 6 krążków wyciętych z liści należących do 6 roślin. Krążki liściowe umieszczano na powierzchni wody w szalkach i po 2 h inkubacji w warunkach wzrostu wykonano pomiary kontrolne (wariant **S1**). Parametry FL chlorofilu określano przy pomocy fluorymetru PAM 200 (prod. Walz). Po pomiarach, jedną serię szalek z krążkami umieszczano w termoluminostacie, gdzie warunki sprzyjały fotoinhibicji [PPFD 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 24°C ogórek i PPFD 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 17°C - pszenżyto] i po 2h wykonywano pomiary parametrów FL (wariant **S2**). Drugą serię szalek z krążkami umieszczano w termoluminostacie w celu poddania ich niskotemperaturowej fotoinhibicji [PPFD 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 4°C – ogórek oraz PPFD 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 4°C - pszenżyto,] i po 2h wykonywano pomiary FL (**S3**). Po pomiarach w celu restytucji powstałych uszkodzeń, odstawiano szalki z badanymi

krążkami do zaciemnionej kamery w temperaturze ok. 20°C i po 24h ponownie wykonywano pomiary parametrów (S2R po S2 oraz S3R po S3).

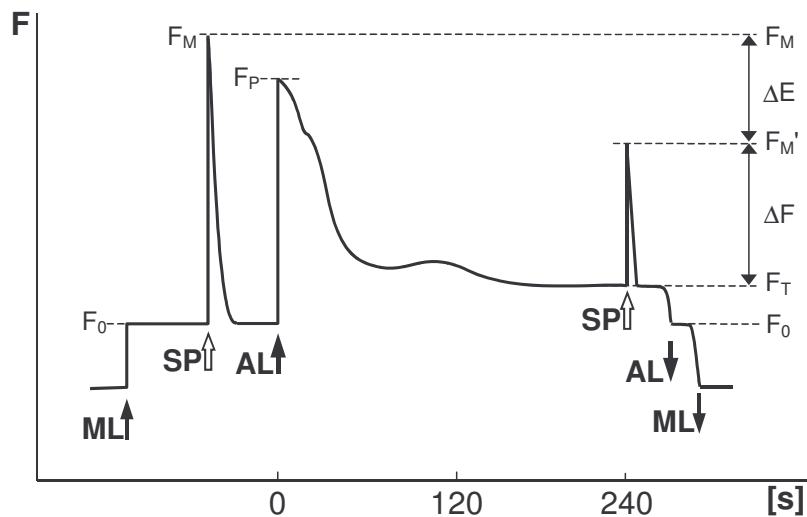
Wyznaczano następujące parametry fluorescencji chlorofilu: F_V/F_M , ETR, Rfd oraz Y (Rys. 1).

- F_V/F_M – maksymalną efektywność reakcji fotochemicznej w PS II wyznaczoną po relaksacji ciemniowej, po redukcji akceptorów w PS II [Bolhàr-Nordenkampf i Öquist 1993],
- ETR - efektywność transportu elektronów w PS II,
- $Rfd = (F_M - F_T)/F_T$ – wskaźnik witalności informujący o potencjalnej aktywności fotosyntetycznej w danych warunkach świetlnych [Lichtenthaler i in. 1986];
- $Y = (F'_M - F_T)/F'_M$ – maksymalną wydajność konwersji energii fotonów PAR na energię chemiczną w danych warunkach świetlnych tzn. przy danej wartości AL [Schreiber 1997],
- F_0 – fluorescencję zerową, wskaźnik strat energii wzbudzenia w antenach energetycznych,
- F_M – fluorescencję maksymalną po redukcji akceptorów w PS II i po adaptacji ciemniowej,
- $F_V = F_M - F_0$ – fluorescencję zmienną wyznaczoną po adaptacji ciemniowej,
- F_T – fluorescencję chlorofilu w stacjonarnej fazie fotosyntezy przy danym AL,
- F'_M – fluorescencję maksymalną przy danej wartości AL [van Kooten i Snel 1990].

Wyniki pomiarów (średnie z 6) przedstawiono w tabelach, porównano je przy pomocy testu t-Studenta, a gwiazdkami oznaczono średnie różniące się istotnie na danym poziomie istotności.

Wyniki i dyskusja

Pomiary fluorescencyjne wykonane w warunkach wzrostu – S1, wykazały, że maksymalna efektywność reakcji fotochemicznej w PS II wyznaczona po relaksacji ciemniowej – F_V/F_M , była u pszenżyta istotnie niższa w porównaniu z tym samym parametrem wyznaczonym dla liści ogórka (Tab. 1). Natomiast wartość wskaźnika witalności – Rfd, wyznaczona w tych samych warunkach okazała się o 14% wyższa dla pszenżyta w porównaniu z wartością wskaźnika dla ogórka. Pozostałe wartości parametrów fluorescencji chlorofilu w liściach obu badanych gatunków były zbliżone. Pod wpływem zwiększonego napromieniowania (wariant S2) nastąpiła inhibicja reakcji fotosyntezy w badanych fragmentach liści obu gatunków roślin. Uwidocznilo się to w umiarkowanym obniżeniu wartości parametru F_V/F_M dla pszenżyta i znacznym spadku tej wartości dla roślin ogórka. Wskazuje to na zmniejszenie potencjalnej efektywności reakcji fotochemicznej w PS II. W podobny sposób obniżyła się także wartość wskaźnika witalności Rfd, który informuje o współdziałaniu reakcji fazy świetlnej z reakcjami biochemicznymi w ciemnej fazie fotosyntezy. Uwagę zwraca znaczne zmniejszenie efektywności transportu elektronów w PS II (parametr ETR) oraz zdolność do konwersji energii fotonów PAR na energię chemiczną w warunkach świetlnych (Y) w liściach ogórka.



Rys. 1. Zmiany wydajności fluorescencji chlorofilu w liściu podczas pomiaru metodą nasycających impulsów światła (PAM 200, Walz). Opis rys. 1 wg Schreiber [1997].

Fig. 1. Changes in leaf chlorophyll fluorescence efficiency during measurement with saturating light pulses (PAM 200, Walz). Details of Fig. 1 according to Schreiber [1997].

ML - zmodulowane impulsowo światło pomiarowe (PPFD $0,04 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; $\lambda_{\text{max}}=650 \text{ nm}$),
SP - krótki, silny impuls światła nasycającego (0,8 s, PPFD $3500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; $\lambda_{\text{max}}=665 \text{ nm}$),
AL – światło aktywności (PPFD $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; LED, $\lambda_{\text{max}}=665 \text{ nm}$).

Po dobowej restytucji (S2R; Tab. 2), wartości wyznaczanych parametrów znacznie wzrosły, szczególnie dla roślin pszenżyta, nie osiągając jednak wartości kontrolnych - S1.

Tabela 1. Wartości parametrów fluorescencji chlorofilu w liściach pszenżyta odm. Wanad i ogórka odm. Julian F1 wyznaczone w wariantcie kontrolnym – S1.

Table 1. Chlorophyll fluorescence parameters in the leaves of triticale cv. Wanad and cucumber cv. Julian F1 in the control variant – S1.

	F_v/F_M	ETR	Rfd	Y
Wanad	0,778	53,3	2,42	0,496
Julian F1	0,796	54,0	2,12	0,502
	(*)	r.n.	(***)	r.n.

Różnice istotne odpowiednio na poziomach istotności: $p < 0,05$ () lub $p < 0,001$ (***)*

Difference significant on the significance level $p < 0,05$ () or $p < 0,001$ (***), respectively.*

r.n. różnica nieistotna; n.s. difference not significant.

Wartości parametrów fluorescencji dla liści ogórka po restytucji wzrosły w zróżnicowanym stopniu, jednak wszystkie pozostały na poziomie zdecydowanie niższym od odpowiednich wartości wyznaczonych w wariancie kontrolnym. Wysoki poziom napromieniowania PAR przy temp. 4C (wariant S3; Tab. 3), wywołał podobnie silną fotoinhibicję reakcji fazy świetlnej w tkankach liści, szczególnie dużą u ogórka. Uwagę zwracają niskie wartości Rfd w liściach obu gatunków oraz skrajnie niskie (ok. 2% kontroli) wartości ETR i Y w liściach ciepłolubnego ogórka. Procesy naprawcze po 24 h restytucji (S3R; Tab.3) poprawiły znacznie efektywność reakcji fotosyntezy w liściach pszenżyta, a tylko w niewielkim stopniu w liściach ogórka.

Tabela 2. Wartości parametrów fluorescencji chlorofilu w liściach pszenżyta odm. Wanad i ogórka odm. Julian F1 wyznaczone w warunkach stresu świetlnego – S2 i po 24h restytucji S2R.

Table 2. Chlorophyll fluorescence parameters in the leaves of triticale cv. Wanad and cucumber cv. Julian F1 under light stress conditions – S2 and after 24h recovery S2R.

		F_v/F_M	ETR	Rfd	Y
S2	Wanad	0,626	39,7	1,07	0,369
	Julian F1	0,332	7,62	0,749	0,071
		(***)	(***)	(***)	(***)
S2R	Wanad	0,740	48,8	2,07	0,454
	Julian F1	0,664	37,6	1,62	0,350
		(**)	(***)	(***)	(***)

*Różnice istotne odpowiednio na poziomach istotności: $p < 0,01$ (**) lub $p < 0,001$ (***).*

*Difference significant on the significance level $p < 0,01$ (**) or $p < 0,001$ (***), respectively.*

W procesie restytucji wartość parametru Y dla ogórka osiągnęła zaledwie 15% wartości kontroli, co świadczy, że wydajność kluczowej dla fotosyntezy reakcji fotochemicznej pozostaje nadal na niskim poziomie. Tak niskie wartości parametrów fluorescencji chlorofilu świadczą o poważnych i nieodwracalnych uszkodzeniach aparatu fotosyntetycznego w tkankach liści ogórka, zapoczątkowanych przez stres oksydacyjny.

Tabela 3. Wartości parametrów fluorescencji chlorofilu w liściach pszenżyta odm. Wanad i ogórka odm. Julian F1 wyznaczone w warunkach stresu świetlnego i chłodu – S3 oraz wyznaczone po dobowej restytucji – S3R..

Table 3. Chlorophyll fluorescence parameters in the leaves of triticale cv. Wanad and cucumber cv. Julian F1 under light stress conditions and chill – S3 and after 24h recovery – S3R.

		F_V/F_M	ETR	Rfd	Y
S3	Wanad	0,393	22,9	0,468	0,213
	Julian F1	0,207	1,23	0,266	0,011
		(***)	(***)	(***)	(***)
S3R	Wanad	0,710	47,6	1,86	0,443
	Julian F1	0,332	8,33	0,639	0,078
		(***)	(***)	(***)	(***)

Różnica istotna na poziomie istotności $p < 0,001$ (***)
 Difference significant on the level $p < 0,001$ (***)

Według Schreiber [1997] pomiar parametru Y nie wymaga wstępnej adaptacji ciemniowej oraz kilkuminutowego okresu ustalania stacjonarnej fazy fotosyntezy i z tego względu parametr ten jest dogodny do szybkich, masowych badań odpornościowych w hodowli roślin oraz monitoringu zagrożeń ekofizjologicznych.

Wnioski

1. Efektywność reakcji fotosyntezy w liściach badanych odmian ogórka i pszenżyta, które oceniano metodą fluorescencyjną, w znaczący sposób uległa pogorszeniu (objawy fotoinhibicji) pod wpływem wywołanego stresu świetlnego.
2. Po jednodobowej restytucji objawy fotoinhibicji w pełni ustąpiły w liściach pszenżyta oraz w znacznym stopniu także i w tkankach liści ogórka.
3. Pięciokrotnie podwyższone napromieniowanie liści przy obniżonej temperaturze (4°C) spowodowały znaczne obniżenie wartości wyznaczanych parametrów fluorescencji chlorofilu, które okazały się w znacznej mierze odwracalne dla pszenżyta, natomiast w przypadku ogórka sygnalizowały stan utrwalonej dysfunkcji aparatu fotosyntetycznego.
4. Można przypuszczać, że w efekcie niskotemperaturowej fotoinhibicji, w tkankach liści chłodowrażliwego ogórka nastąpiły poważne uszkodzenia funkcji błon biologicznych, wskutek zapoczątkowanego stresu oksydacyjnego.

Bibliografia

Bolhàr-Nordenkamp H. R., Öquist G. 1993. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: Photosynthesis and production in a changing environment. Eds. D. O. Hall et al. Chapman and Hall, London: 193-206.

Foyer C. H., Lelandais M., Kunert K. J. 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.*, 92, 696-717.

Kacperska A. 2002. Reakcje roślin na abiotyczne czynniki stresowe [w: Fizjologia roślin]. Red. J. Kopcewicz i St. Lewak. PWN, Warszawa: 612-678.

Krause G. H., Somersalo S. 1989. Fluorescence as a tool in photosynthesis research: application in studies of photoinhibition, cold acclimatisation and freezing stress. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, B 323: 281-293.

Lichtenthaler H., Buschmann C., Rinderle U., Schmuck G. 1986. Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology. *Radiat. Environ. Biophys.* 25: 297-308.

Lichtenthaler H. K. 1996. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J. Plant Physiol.*, 148: 4-14.

Maxwell K., Johnson G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Experimental Botany*, 51(345): 659-668.

Murkowski A., Skórska E. 1997. Chlorophyll *a* luminescence - an index of photoinhibition damages. *Current Topics in Biophys.*, 21 (1): 72-78.

Murkowski A. 2002a. Wpływ chłodu i zwiększonej PAR na fluorescencję chlorofilu w liściach roślin pomidora. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 481: 199-203.

Murkowski A. 2002b. Fotoinhibicja i stres oksydacyjny. W: Oddziaływanie czynników stresowych na luminescencję chlorofilu w aparacie fotosyntetycznym roślin uprawnych – Monografia. *Acta Agroph.*, 61: 108-123.

Murkowski A., Skórska E., 2004: Chlorophyll fluorescence in research of chill and light stress in cucumber plants from *in vitro* culture during acclimation. Horticulture and Vegetable Growing, 23(2): 192-198.

Schapendonk A.H.C.M., Van der Putten P.E.L., Dolstra O., Tonk W.I.M. 1992. Chlorophyll fluorescence: a non-destructive method for detecting damage in the photosynthetic apparatus in plants. Acta Hort., 304: 61-70.

Schreiber U. 1997. Chlorophyll fluorescence and photosynthetic energy conversion. Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany.

Schreiber U., Bilger W., Hormann H., Neubauer C. 2000. Chlorophyll fluorescence as a diagnostic tool: basics and some aspects of practical relevance. In: Photosynthesis: a comprehensive treatise. Ed. A.S. Raghavendra. Cambridge University Press, 24: 320-336.

Skórska E. 2002. Chlorophyll fluorescence of UV-B irradiated bean leaves subjected to chilling in light. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol., 481: 391-394.

Starck Z. 1998. Reakcja roślin na multistresowe warunki środowiska w aspekcie produkcji i dystrybucji masy [w: Ekofizjologiczne aspekty reakcji roślin na działanie abiotycznych czynników stresowych]. Praca zbiorowa pod red. S. Grzesiaka i in., Zakł. Fizjol. Roślin. PAN, Kraków: 21-31.

Van Kooten O., Snel J. F. H. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. Photosynth. Res. 25: 147-150.

Evaluation of crop plants' sensitivity to selected environmental stresses using the fluorescence method

Summary

Effect of high irradiance (PPFD $800 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) at 24°C and 4°C on chlorophyll fluorescence in cucumber cv. Julian F1 leaves and (PPFD $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) at 17°C and 4°C on chlorophyll fluorescence in triticale cv. Wanad leaves was studied. Measurements were carried out by means of a PAM-type fluorometer in order to estimate the parameters: F_v/F_M , ETR, Rfd, and Y. An analysis of changes of these parameters, which occurred under stress, shows that triticale plants, as compared with cucumber, demonstrate lower sensitivity to increased irradiance, particularly at low temperature. The studied leaf fragments were recovered for 24 hours in darkness and at room temperature, after which the measurements of chlorophyll fluorescence were repeated. During the recovery, all the parameters for triticale increased considerably and approached the control values, while such increase for cucumber was relatively lower. The photosynthesis disturbances in the leaves of chill-sensitive cucumber that persisted as a result of high irradiance at low temperature demonstrates serious and irreversible effect of light stress.

Key words: chill, chlorophyll fluorescence, cucumber, photoinhibition, photosynthesis, stress factors, triticale