

MAGDALENA D. CETNER¹, PIOTR DĄBROWSKI², IZABELA A. SAMBORSKA¹,
IZABELA ŁUKASIK¹, TATIANA SWOCZYNA³, STEFAN PIETKIEWICZ¹, WOJCIECH BABA⁴,
HAZEM M. KALAJ¹

¹Katedra Fizjologii Roślin

²Katedra Kształtowania Środowiska,

³Katedra Ochrony Środowiska

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

⁴Zakład Ekologii Roślin

Instytut Botaniki

Uniwersytet Jagielloński

Lubicz 46, 31-512 Kraków

E-mail: piotr.andrzej.dabrowski@gmail.com

wojciech.baba@uj.edu.pl

ZASTOSOWANIE POMIARÓW FLUORESCENCJI CHLOROFILU W BADANIACH ŚRODOWISKOWYCH

WSTĘP

Od lat trwają w nauce poszukiwania różnorodnych narzędzi służących do oceny stanu środowiska przyrodniczego, identyfikacji zagrożeń oraz przewidywania ryzyka wystąpienia zaburzeń w jego funkcjonowaniu. W przypadku produkcji roślinnej, poszukuje się metod przewidywania i oceny wpływu różnych niesprzyjających warunków środowiska (stresorów) na stan fizjologiczny roślin, ich wzrost oraz plonowanie. Zadanie to jest niezwykle skomplikowane, ponieważ rośliny charakteryzuje złożony mechanizm odporności/tolerancji. Rośliny należą do organizmów, które muszą dostosować się do warunków środowiska i przetrwać wszystkie stresory *in situ*, czyli w miejscu wzrostu. Ujemne skutki oddziaływania niekorzystnych warunków środowiska na rośliny polegają na zakłóceniu ich wzrostu i rozwoju, poprzez zaburzenie procesów metabolicznych przebiegających w komórce oraz na zmianie właściwości fizykochemicznych struktur komórkowych. Do najczęściej występujących zaburzeń funkcji metabolicznych zalicza się: zahamowanie procesu fotosynte-

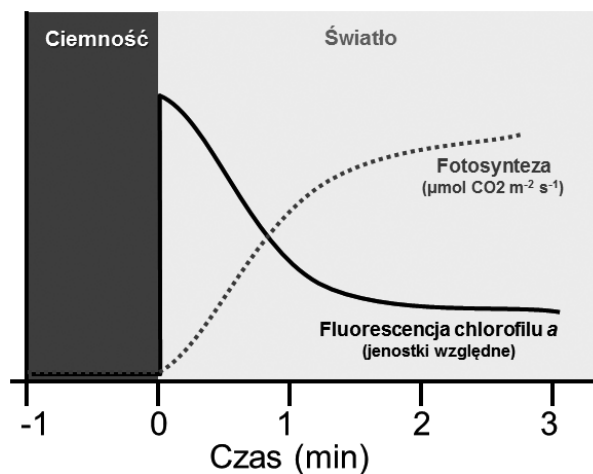
zy, zaburzenia procesu oddychania i zahamowanie wzrostu. Natomiast typową zmianą właściwości fizykochemicznych struktur komórkowych jest zaburzenie struktury błony komórkowej prowadzące do utraty zdolności do selektywnej przepuszczalności. Wstępną metodą oceny dysfunkcji metabolizmu i zmian strukturalnych u roślin jest wizualna obserwacja zmian barwy lub stopnia zasychania tkanki. Ilościowa ocena tego typu uszkodzeń często odnosi się do umownej skali. Metoda ta bywa obciążona dużym błędem, ponieważ nie wszystkie obserwacje można ocenić obiektywnie. Dążenie do nadania cech obiektywnych obserwacjom zaburzeń funkcji metabolicznych i zmian strukturalnych zaowocowało wypracowaniem metod precyzyjnych, opartych na wynikach badań laboratoryjnych (np. metoda konduktometryczna, pomiary aktywności niektórych enzymów kluczowych dla metabolizmu) lub wykorzystujących specjalistyczną aparaturę (np. analizator gazu w podcierwieni IRGA do pomiaru wymiany gazowej roślin). Metody laboratoryjne są na ogół inwazyjne i destrukcyjne, często również czasochłonne i kosztowne, co ogranicza możliwość śledzenia

in vivo reakcji roślin na niekorzystne warunki środowiska. Z tego powodu fizjologowie roślin coraz częściej posługują się aparaturą elektroniczną. Przenośne, wysoce skomputeryzowane urządzenia umożliwiają wykonanie nieinwazyjnych i relatywnie szybkich pomiarów poza laboratorium, bezpośrednio w środowisku wzrostu roślin. Jednymi z najpopularniejszych instrumentów stosowanych w badaniu oddziaływania na rośliny różnorodnych stresorów, zarówno abiotycznych, jak i biotycznych, są fluorymetry. Urządzenia te rejestrują fluorescencję chlorofilu *a*, czyli reemisję energii świetlnej pochłoniętej przez anteny energetyczne aparatu fotosyntetycznego. Metoda ta pozwala ocenić zmiany parametrów fluorescencji u wszystkich organizmów prowadzących fotosyntezę. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie możliwości wykorzystania pomiarów fluorescencji chlorofilu *a* w badaniach roślin oraz innych organizmów fotosyntezujących. W pracy scharakteryzowano zjawisko fluorescencji chlorofilu, opisano metody jej pomiaru oraz przedstawiono możliwości zastosowania tych metod w badaniach reakcji aparatu fotosyntetycznego na stres.

FLUORESCENCJA CHLOROFILU JAKO WSKAŹNIK WYDAJNOŚCI FOTOSYNTEZY

Promieniowanie słoneczne w zakresie 400-700 nm nazywa się promieniowaniem fotosyntetycznie czynnym (ang. photosynthetically active radiation, PAR). Za absorpcję promieniowania odpowiadają cząsteczki barwników fotosyntetycznych: chlorofile i karotenoidy, zlokalizowane w kompleksach zbierających światło (nazywanych także antenami energetycznymi, ang. light harvesting complexes, LHC). Kompleks antenowy składa się z wielu cząsteczek chlorofilu i karotenoidów połączonych z białkami. Energia z tych kompleksów jest przekazywana do centrów reakcji fotosystemu II i fotosystemu I (PSII i PSI). Energia słoneczna absorbowana przez barwniki jest wykorzystywana do uruchomienia reakcji fotochemicznych fotosyntezy. Jednak nie cała energia przechwycona przez barwniki jest wykorzystana, jej część zostaje utracona w postaci ciepła lub jest emitowana jako fluorescencja chlorofilu (KALAJI i ŁOBODA 2010). Fluorescencja chlorofilu, podobnie jak mechanizm rozpraszania energii w postaci ciepła, służy do usuwania nadmiaru pochłoniętej energii świetlnej. Fluorescencja chlorofilu jest więc pewnego rodzaju bezpiecznikiem, „wentylem bezpieczeństwa” ochraniającym wrażliwe na uszkodzenia komponenty aparatu fotosyntetycznego. Wprawdzie emisja fluorescencji pochodzi z

chloroplastów, ale jest powiązana ze wszystkimi innymi procesami metabolicznymi i fizjologicznymi zachodzącymi w komórce roślinnej. Stąd każda zmiana w otoczeniu, powodująca zmiany przebiegu tych procesów, będzie wpływała na proces fotosyntezy. W 1931 r. KAUTSKY i HIRSCH zbadali charakter przebiegu krzywej indukcji fluorescencji chlorofilu i stwierdzili, że istnieje odwrotna zależność pomiędzy intensywnością fluorescencji, a intensywnością fotosyntezy, wyrażonej jako asymilacja CO₂ w czasie (Ryc. 1). Jedną z upowszechnionych metod fluorymetrycznych jest określenie udziału energii wykorzystanej w procesach fotochemicznych oraz energii utraconej w postaci ciepła, co pozwala na oszacowanie efektywności procesu konwersji energii promieniowania PAR w reakcjach fazy świetlnej fotosyntezy. W badaniach z zakresu fizjologii roślin, nieinwazyjny pomiar fluorescencji pozwala na określenie nie tylko aktywności fotosyntetycznej, ale też reakcji rośliny na takie niekorzystne warunki środowiska, jak zacienienie, obecność zanieczyszczeń czy niedobory makro- i mikrośladników (KALAJI 2011). Intensywność fluorescencji ulega różnym modyfikacjom w zależności od czasu trwania i natężenia stresu. Jeszcze zanim pojawią się widoczne symptomy uszkodzeń, można wykryć zmiany u roślin w warunkach stresu stosując pomiary fluorescencji chlorofilu (LICHTENTHALER 2007). Niestety, za pomocą fluorescencji chlorofilu nie można obecnie określić charakteru stresu. Może ona natomiast posłużyć jako kryterium selekcji w hodowli roślin czy ochronie środowiska. Pomiar fluorescencji pozwala ponadto na ocenę ogólnego stanu fizjologicznego roślin, szczególnie w celu optymalizacji warunków przechowywania warzyw, owoców, kwiatów, bądź oceny



Ryc. 1. Zależność pomiędzy intensywnością fotosyntezy a fluorescencją chlorofilu (KAUTSKY i HIRSCH 1931, zmodyfikowano).

po zbiorze stopnia ich dojrzałości konsumpcyjnej lub przetwórczej (BAKER i ROSENQUIST 2004, KALAJI i GUO 2008).

METODY POMIARU FLUORESCENCJI CHLOROFILU

Metoda oparta na pomiarze sygnału fluorescencji chlorofilu jest bardzo popularna z uwagi na wysoką czułość i wiarygodność otrzymanych wyników. Można ją stosować wszędzie, od poziomu komórki do całego ekosystemu. Urządzenia do pomiaru fluorescencji chlorofilu nazywa się fluorymetrami lub miernikami stresu (KALAJI i współaut. 2014b). Mierniki te dają możliwość przywydzywania wpływu stresora na proces fotosyntezy i lokalizowania jego wpływu w fotosyntetycznej maszynie poprzez analizę przepływu energii w błonach tylakoidów, czyli transferu energii w łańcuchu transportu elektronów. Pomiar fluorescencji chlorofilu wymaga oddzielenia mierzonego sygnału od oświetlenia aktywnego (tj. wysokoenergetycznego: 800 μmol fotonów $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), które uruchamia reakcje fotochemiczne fotosyntezy, a także samą fluorescencję chlorofilu. Do pomiaru fluorescencji stosuje się spektrofluorymetry działające na zasadzie spektroskopii emisyjnej (czyli oceny widma emitowanego spontanicznie lub po poddaniu badanej substancji działaniu określonego bodźca fizycznego). Powstało dotychczas wiele technik pomiarowych, dostępna też jest szeroka gama fluorymetrów. Do najbardziej rozpowszechnionych metod zalicza się pomiar fluorescencji bezpośredniej (ang. prompt fluorescence, PF). Pomiaru dokonuje się po zaadaptowaniu próbki w ciemności przez ok. 20-30 minut. Ma to na celu wygaszenie reakcji fazy świetlnej fotosyntezy i całkowite zredukowanie centrów reakcji (ang. reaction center, RC) obu fotosystemów. Po adaptacji, próbkę naświetla się światłem ciągłym o fali krótszej niż 670 nm. Jednocześnie fotodetektor rejestruje fluorescencję chlorofilu w zakresie 680-760 nm (MURKOWSKI 2002). Mierzonymi parametrami są:

F_0 – fluorescencja początkowa (zerowa) po adaptacji do ciemności. Parametr ten jest wskaźnikiem strat energii wzbudzenia podczas jej przekazywania z anten energetycznych do centrum reakcji PSII (MURKOWSKI 2002, BAKER i ROSENQUIST 2004). Wysokie wartości tego parametru świadczą o mniejszej sprawności przekazywania energii wzbudzenia pomiędzy cząsteczkami chlorofilu. Jest to pierwszy punkt na krzywej indukcji fluorescencji chlorofilu.

F_M – fluorescencja maksymalna po adaptacji do ciemności. Jest to maksymalne natężenie fluorescencji. Jej zmniejszenie w

stosunku do próby kontrolnej świadczy o wystąpieniu stresu, w którego wyniku nie wszystkie akceptory elektronów w PSII zostały całkowicie zredukowane (KALAJI i ŁOBODA 2010).

T_{FM} – czas osiągnięcia poziomu maksymalnej fluorescencji chlorofilu F_M . Parametr ten określa czas, po jakim został osiągnięty punkt F_M (LICHTENTHALER i współaut. 2004). Jego wartość jest tym większa, im dłużej roślina znajdowała się pod wpływem czynnika stresowego.

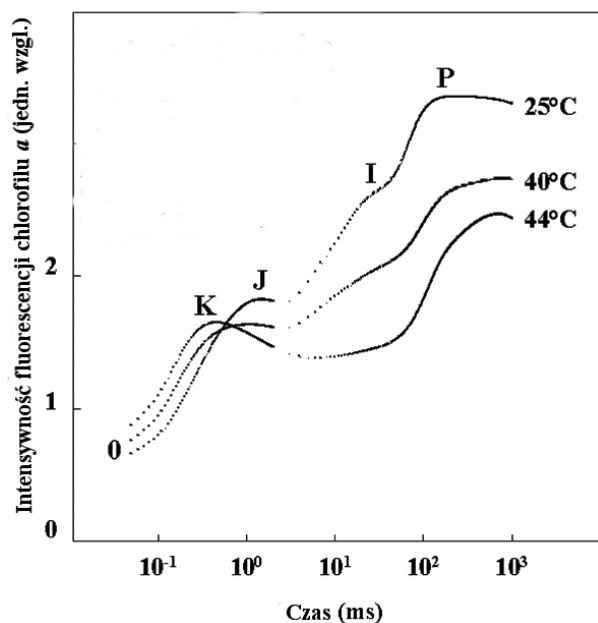
$F_V = F_M - F_0$ – fluorescencja zmienna. Wartość tego parametru uzależniona jest od maksymalnej wydajności kwantowej PSII. Czym niższe wartości tego parametru, tym wydajność PSII jest mniejsza (KALAJI i ŁOBODA 2010).

F_V/F_M – maksymalna fotochemiczna wydajność PSII. Parametr ten jest uznany za wiarygodny miernik aktywności fotochemicznej aparatu fotosyntetycznego. W optymalnych warunkach wzrostu rośliny, jego wartość powinna wynosić około 0,85 jednostek względnych (ANGELINI i współaut. 2001). Obniżenie wartości tego parametru świadczy o wystąpieniu stresu, przejawiającego się w postaci fotoinhibicji. Bardzo niskie wartości tego parametru (0,2-0,3) wskazują na nieodwracalne zmiany w strukturze PSII. MAXWELL i JOHNSON (2000) zauważyli jednak, że parametr ten nie jest proporcjonalny do intensywności fotosyntezy (wyrażanej poprzez asymilację CO_2 , czy wydzielanie O_2). KALAJI i współaut. (2014b) podkreślili, że parametr ten nie jest wrażliwy na niektóre stresy (np. susza).

Inną techniką jest pomiar modulowanej fluorescencji chlorofilu w systemie PAM (ang. pulse amplitude modulation), w którym źródło promieniowania świetlnego użyte do wzbudzenia fluorescencji chlorofilu jest włączane i wyłączane z określoną częstotliwością (12 s). Fotodetektor ma możliwość rejestracji wyłącznie składowej zmiennej wzbudzonej fluorescencji w badanej próbce, co pozwala zmierzyć fluorescencję w warunkach aktualnego natężenia PAR. Do najważniejszych parametrów mierzonych tą techniką należą:

F_0' – fluorescencja początkowa bezpośrednio po wyłączeniu światła aktywnego lub fluorescencja zerowa na świetle. Parametr ten jest miarą emisji fluorescencji, gdy pierwsze stabilne akceptory elektronów w PSII plastochinony A (Q_A) są utlenione i zachodzi wygaszanie niefotochemiczne.

F_M' – fluorescencja maksymalna materiału (np. tkanki roślinnej) zaadaptowanego do światła. Parametr ten jest wyznaczony po wysycającym błysku w obecności światła aktywnego.



Ryc. 2. Zależność pomiędzy zmianą temperatury a przebiegiem krzywej indukcji fluorescencji chlorofilu (Strasser i współaut., dane niepublikowane).

Yield – wydajność kwantowa reakcji fotochemicznej w PSII. Na podstawie tego parametru określany jest stosunek kwantów

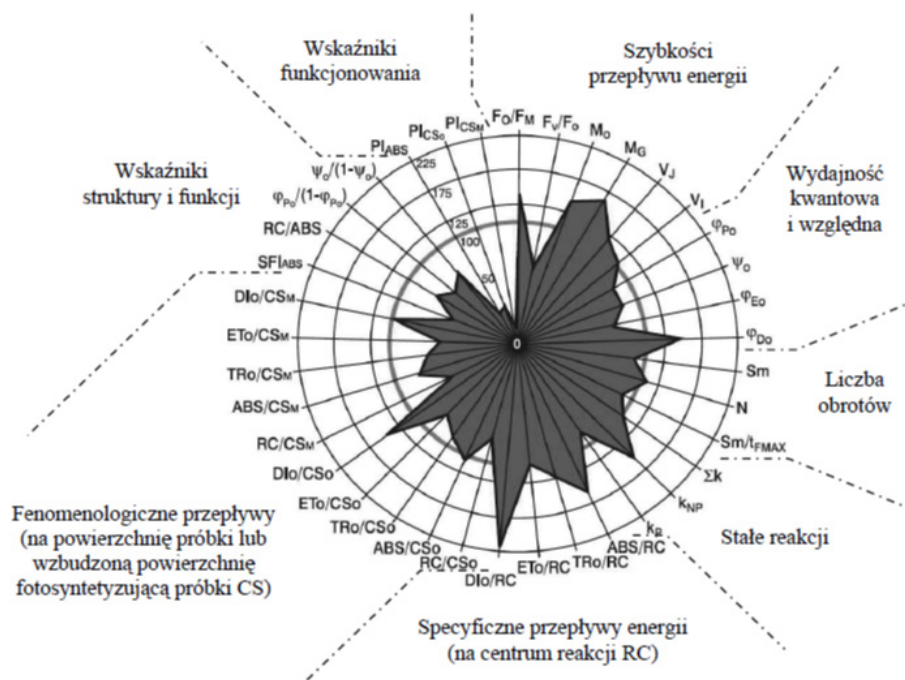
wykorzystanych w przemianach fotochemicznych do całkowitej liczby zaabsorbowanych kwantów PAR (GENTY i współaut. 1989).

ETR – szybkość przepływu elektronów przez fotosystemy (ang. electron transport rate). Czynniki stresowe obniżają jego wartość (KALAJI i RUTKOWSKA 2004).

qP – wygaszanie fotochemiczne. Parametr ten określa proporcję energii świetlnej zaabsorbowanej przez PSII do energii wykorzystanej przez otwarte centra do reakcji fotosyntezy (MAXWELL i JOHNSON 2000).

qNP – wygaszanie niefotochemiczne. Wartość tego parametru mieści się w granicach 0–1 i jest ona regulowana przez niewielkie zmiany pH po obu stronach błon tylakoidów (WEISS i REIGOSA 2003).

Zastosowanie precyzyjnych fluorymetrów typu PEA (ang. Plant Efficiency Analyser), pozwalających na pomiar fluorescencji nawet co 10 mikrosekund, oraz przedstawienie danych na skali logarytmicznej pozwoliło zauważyć niejednorodny przebieg krzywej indukcji fluorescencji pomiędzy jej wartością początkową (F_0) a maksymalną (F_M), uzyskiwaną po kilkuset milisekundach w przypadku naświetlenia próbki światłem wysycającym ($3000 \mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{s}^{-1}$ lub więcej) (KALAJI i współaut. 2014b). Na tak przedstawionej krzywej indukcji fluorescencji wyróżnić można punkty pojawiające się



Ryc. 3. Parametry testu OJIP (KALAJI 2011) buraków cukrowych rosnących w warunkach niedoboru magnezu. Zacieniony obszar przedstawia uśrednione wartości parametrów obliczonych dla próby doświadczalnej w stosunku do próby kontrolnej (grubszy okrąg o wartości 100 proc.). Rozwinięcie znaczenia parametrów w pracy KALAJI (2011).

w określonych momentach pomiaru: O (ok. 0,02 ms), J (2 ms), I (30 ms) oraz P (ok. 300 ms, odpowiadające F_m). Znaczenie wzajemnych relacji pomiędzy wartościami tych punktów zostało wyjaśnione przez STRASSERA i współaut. (2004) jako odzwierciedlenie przepływu wzbudzonych elektronów (lub prościej: energii) poprzez kolejne struktury aparatu fotosyntetycznego (teoria przepływu energii w błonach tylakoidów). Wszelkie zaburzenia w tych strukturach lub ich funkcjonowaniu widoczne są w postaci zmian w przebiegu krzywej indukcji (Ryc. 2). Analiza fluorescencji w punktach O-J-I-P (test OJIP) pozwala na precyzyjne zbadanie kondycji fizjologicznej aparatu fotosyntetycznego oraz oszacowanie na tej podstawie vitalności rośliny (STRASSER i współaut. 2000). Jedną z popularnych metod przedstawiania wyników testu OJIP jest wykres radarowy. Przykładowe wyniki doświadczalne uzyskane dzięki analizie OJIP ilustruje Ryc. 3. Wartości parametrów obliczone dla próby doświadczalnej (w tym przypadku roślin buraka cukrowego w warunkach niedoboru magnezu w środowisku wzrostu) są przedstawiane w odniesieniu do próby kontrolnej. Parametry zostały tu przyporządkowane do ośmiu grup, zgodnie z ich znaczeniem. Opis poszczególnych parametrów jest dostępny w pracy KALAJI (2011).

PRZYKŁADY ZASTOSOWANIA FLUORESCENCJI CHLOROFILU W BADANIACH ŚRODOWISKOWYCH

Pomiary fluorescencji chlorofilu są wykorzystywane do monitorowania reakcji PSII na zmiany w natężeniu PAR (CAI i XU 2002) oraz w składzie spektralnym (FIGUEROA i współaut. 2003). PAR jest źródłem energii niezbędnej dla roślin, jednak zbyt duże jego natężenie może być czynnikiem stresowym, powodującym fotoinhibicję. Gdy intensywność światła jest za wysoka, część energii nie może być zaabsorbowana przez barwniki fotosyntetyczne. Prowadzi to do dysfunkcji aparatu fotosyntetycznego (STRIZH i współaut. 2005). W warunkach wysokiej radiacji następuje nadmierny dopływ fotonów do anten, co powoduje nadmiar stanów wzbudzenia w centrach reakcji PSII (DEMMIG-ADAMS i współaut. 1995). Nie tylko nadmierne natężenie, ale również spektrum światła może oddziaływać hamująco na transport elektronów w zależnej od światła fazie fotosyntezy. Zielenice osiągają najwyższe wartości wskaźnika transportu elektronów ETR przy naturalnym świetle słonecznym oraz czerwonym oświetleniu, natomiast u krasnorostów maksymalne wartości ETR zmierzono przy białym oświetleniu, a minimalne przy czer-

wonym (FIGUEROA i współaut. 2003). Innym czynnikiem ograniczającym produktywność roślin są zmiany temperatury. W zależności od wielkości różnicy między temperaturą optymalną a aktualną, zachodzą w organizmie roślinnym liczne zmiany w funkcjonowaniu maszynierii fotosyntetycznej. Na podstawie pomiarów fluorescencji chlorofilu stwierdzono, że odpowiedzią rośliny na zbyt wysoką temperaturę może być obniżenie stosunku zredukowanych akceptorów Q_A^- do centrów reakcji. Stwierdzono również zmniejszenie maksymalnej wydajności kwantowej PSII (CHEN i współaut. 2009). Został także potwierdzony wpływ niskiej temperatury na wydajność aparatu fotosyntetycznego (BORAWSKA-JARMOŁOWICZ i współaut. 2014). Do wykrywania reakcji roślin na zmiany temperatury szerokie zastosowanie znalazł również test OJIP (STRASSER i współaut. 2000). Przykładową zależność pomiędzy zmianą temperatury a przebiegiem krzywej indukcji fluorescencji chlorofilu przedstawiono na Ryc. 2. Niedobór wody staje się coraz większym problemem w rolnictwie, prowadząc do znacznego zmniejszenia plonów (STANKIEWICZ 2007). Susza silnie hamuje proces fotosyntezy. Niedobór wody uniemożliwia efektywne wykorzystanie pobranej energii świetlnej, co objawia się zwiększonym jej rozpraszaniem poprzez ciepło i zwiększoną fluorescencją. Zmiany te następują zanim na roślinie pojawią się widoczne gołym okiem oznaki więdnienia. Stąd metoda pomiarów fluorescencji chlorofilu znalazła zastosowanie przy prowadzeniu biomonitoringu mającego na celu sygnalizowanie wystąpienia stresu suszy (CETNER i współaut. 2014). Szkodliwe działanie soli w glebie polega na obniżeniu potencjału osmotycznego w roztworze glebowym. Prowadzi to do trudności w pobieraniu wody, a także do zmian w pobieraniu składników pokarmowych (KALAJI i NALBORCZYK 1991, KALAJI i PIETKIEWICZ 1993). Na podstawie pomiarów fluorescencji chlorofilu stwierdzono, że podczas stresu solnego zachodzą zmiany w funkcjonowaniu PSII; wykazuje on mniejszą zdolność do wychwycenia energii. Odnotowano także wzrost wygaszania niefotochemicznego (KALAJI i RUTKOWSKA 2004, YANG i współaut. 2008). Zasolenie gleb jest poważnym problemem terenów zurbanizowanych, znajdujących się w klimacie umiarkowanym. Stosowanie soli, która obniża temperaturę topnienia śniegu, powoduje jego rozpuszczanie i spływ z ulic nawet przy lekkim mrozie. Spływająca sól przenika do gruntu stwarzając nieprzyjazne środowisko dla roślin. Badania przeprowadzone na drzewach miejskich w Warszawie wykazały, że niektóre gatunki, np. lipa drobnolistna (*Tilia cordata* Mill.) czy miłorząb chiński (*Ginkgo biloba* L.),

charakteryzuje wysoka wrażliwość na zasolenie podłoża. W okresie wegetacyjnym u drzew rosnących przy jezdni dochodzi do poważnych uszkodzeń liści i obniżenia sprawności aparatu fotosyntetycznego (SWOCZYNA i współaut. 2010a, b). Na podstawie pomiarów fluorescencji chlorofilu stwierdzono, że wystąpienie niedoboru pierwiastków: N, P, K, Ca, Mg, S i Fe, prowadzi do dysfunkcji aparatu fotosyntetycznego poprzez zmniejszenie wydajności fotochemicznej PSII (ALEKSANDROV i współaut. 2014, KALAJI i współaut. 2014a). Niedobór każdego z wymienionych składników mineralnych powoduje jednak inną reakcję rośliny, przy czym uznaje się, że azot jest głównym czynnikiem limitującym wzrost i plonowanie roślin (KALAJI 2011). Wynika to z faktu, że pierwiastek ten jest jednym z głównych składników budulcowych rośliny, w tym chlorofili. Na podstawie pomiarów fluorescencji chlorofilu określono, że niedobór azotu znacząco zmniejsza pulę akceptorów elektronów w PSII oraz aktywność niektórych enzymów związanych z procesem fotosyntezy, m. in. RuBisCO (CORREIA i współaut. 2005). Do podobnych wniosków doszli ŽIVČÁK i współaut. (2014) na podstawie badań nad wpływem niedoboru azotu na fluorescencję chlorofilu u pszenicy. Pierwiastki zaliczane do metali, niesłusznie zwanych ciężkimi, są uważane za poważny problem środowiskowy, ze względu na ich toksyczność dla ludzi i zwierząt. Skutkuje to ograniczeniem produktywności roślin (QIAN i współaut. 2009) przez hamowanie procesu fotosyntezy. Większe stężenie niektórych metali ciężkich (ołowiu, kadmu czy rtęci) w glebie może prowadzić do gromadzenia się tych pierwiastków w tkankach roślinnych (GWOZEK i współaut. 2011). Działanie metali ciężkich w dużym stopniu jest jednak specyficzne i zależy od samego pierwiastka i gatunku rośliny. Na podstawie pomiarów fluorescencji chlorofilu stwierdzono, że kadm działa negatywnie zarówno na donorową, jak i akceptorową stronę PSII (JANECZKO i współaut. 2005). Według ROMANOWSKIEJ i współaut. (2006), inny, toksyczny pierwiastek: ołów, zmniejsza wygaszanie fotochemicznego (qP), a zwiększa niefotochemiczne (qNP).

INNE PRZYKŁADY ZASTOSOWANIA POMIARÓW FLUORESCENCJI CHLOROFILU

Metoda fluorescencji chlorofilu jest często stosowana do selekcji gatunków lub odmian odpornych na czynniki stresowe oddziałujące zarazem na aparat fotosyntetyczny, jak i na ogólną kondycję roślin i ich plonowanie. Szczególnie dotyczy to selekcji w kierunku tolerancji na suszę. Badania oparte na me-

todzie fluorescencji chlorofilu dotyczą zarówno roślin uprawnych, takich jak pszenica (ŽIVČÁK i współaut. 2008, AKHKHA i współaut. 2013), jak i drzew stosowanych w nasadzeniach miejskich (SWOCZYNA i współaut. 2015). Ciekawym przykładem zastosowania pomiarów fluorescencji chlorofilu jest ocena jakości i stopnia dojrzałości owoców. W ramach współpracy z hodowcami i producentami udało się naukowcom skonstruować system zdalnego i nieinwazyjnego monitorowania stanu fizjologicznego różnych owoców przed i po zbiorze oraz w czasie przechowywania ich w magazynach (DEELL i PRANGE 1995, MATTHEIS i RUDELL 2011). Metoda ta znalazła też zastosowanie do oceny jakości nasion (JALINK i współaut. 1998). Okrywa nasienna po zbiorze nadal zawiera śladową ilość chlorofilu, więc możliwy jest pomiar sygnału fluorescencji, który może być skorelowany z wigorem nasion.

Za pomocą pomiarów fluorescencji można również przeprowadzić badania ekosystemów wodnych. Badania te polegają na szybkiej i rzetelnej analizie zawartości chlorofilu w organizmach wodnych na głębokości do 100 metrów (ZIELINSKI i współaut. 2009). Dodatkową zaletą tego typu badania jest możliwość określenia spektrum emisyjnego barwników fotosyntetycznych tych organizmów i na tej podstawie przyporządkowanie ich do odpowiedniej klasy: sinic, zielenic, okrzemków i kryptofitów (MORENO-OSTOS i współaut. 2006). W ramach współpracy pomiędzy pracownikami Katedry Fizjologii Roślin Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie a Instytutem Badawczym Leśnictwa udało się zastosować tę metodę do oceny jakości wody, która była używana do podlewania sadzonek w szkółkach (OSZAKO i współaut. 2009). Przy pomocy pomiarów fluorescencji chlorofilu monitorowano na Stadionie Narodowym w Warszawie stan murawy przed i w czasie XIV Mistrzostw Europy w Piłce Nożnej UEFA Euro 2012 (dane niepublikowane). W ramach monitoringu środowiska miejskiego prowadzono ocenę stanu fizjologicznego drzew w Krakowie i Warszawie. Na podstawie przeprowadzonych analiz i raportu, Urząd Gminy Centrum Krakowa mógł podjąć decyzję o odnowieniu niektórych osobników, a Zarząd Oczyszczania Miasta w Warszawie o sposobie podlewania drzew rosnących bezpośrednio przy ulicy i kilka metrów od niej (SWOCZYNA i współaut. 2010a, b). W największej skali metoda ta została zastosowana przez Narodową Agencję Aeronautyki i Przestrzeni Kosmicznej Stanów Zjednoczonych NASA, która stworzyła pierwszą mapę stanu fizjologicznego roślin na świecie (<http://www.nasa.gov/>). Natomiast w ramach projektu MODIS, NASA opraco-

wał system ostrzegawczy dla kontynentu amerykańskiego (<http://modis.gsfc.nasa.gov>), oparty na pomiarach sygnału fluorescencji, pochodzącego od sinic występujących w wodach przybrzeżnych. W przypadku zagrożenia biologicznego, system natychmiast wysłał ostrzeżenie do odpowiednich placówek, np. o prawdopodobieństwie wystąpienia katastrofy ekologicznej.

PODSUMOWANIE

Techniki pomiaru fluorescencji znajdują coraz szersze zastosowanie w rolnictwie, gdzie można dokładnie monitorować zmiany zachodzące w uprawach polowych na różnych etapach produkcji roślinnej. Jest to uniwersalny i bardzo szybki sposób oszacowania oraz określenia wpływu różnych niesprzyjających warunków środowiska na sprawne funkcjonowanie aparatu fotosyntezy. Jednocześnie, technika ta umożliwia wczesne zdiagnozowanie wpływu stresora, zanim wystąpią wizualne objawy stresu. To sprawia, że fluorescencja chlorofilu staje się coraz częściej wykorzystywaną techniką do badania stanu roślin oraz pomagającą określić rodzaj oddziałującego stresora. Uniwersalność omawianej metody pozwala na zastosowanie jej nie tylko w produkcji roślinnej, ale również w ochronie środowiska i innych dziedzinach gospodarki.

Streszczenie

Celem opracowania jest przybliżenie szerokiego gronu czytelników zakresu możliwości zastosowania pomiarów fluorescencji chlorofilu w badaniach stanu roślin, poddanych stresom abiotycznym. Zaprezentowano zagadnienia związane z samym zjawiskiem fluorescencji chlorofilu, następnie skupiono się na technice pomiarowej, scharakteryzowano metody pomiaru fluorescencji bezpośredniej i modulowanej (w systemie PAM), a także przybliżono test OJIP stosowany do analizy otrzymanych wyników. Szczególny nacisk położono na znaczenie parametrów fluorescencji chlorofilu. Omówiono też wpływ wybranych czynników środowiskowych na zmiany fluorescencji chlorofilu. Skupiono się na znaczeniu światła, temperatury, suszy, zasolenia gleby, niedoboru składnika mineralnego oraz toksycznego oddziaływania metali. Zaprezentowano także inne przykłady zastosowania fluorescencji chlorofilu, jak kontrola dojrzałości owoców, wigoru nasion czy monitoringu ekosystemów wodnych, również w systemie NASA-MODIS do wykrywania zagrożeń biologicznych. W podsumowaniu podkreślono, że fluorescencja chlorofilu stanowi uniwersalny i szybki sposób oszacowania oraz narzędzie do wykrywania różnych niesprzyjających warunków środowiska mających wpływ na sprawne funkcjonowanie aparatu fotosyntezy.

LITERATURA

- AKHKHA A., BOUTRAA T., KALAJI H., AHMAD P., DĄBROWSKI, P., 2013. *Chlorophyll fluorescence: a potential selection criterion for drought tolerance in selected durum wheat (Triticum durum Desf.) cultivars*. Signpost Open Access J. NanoPhotoBioSci. 1, 147-156.
- ALEKSANDROV V., KRASTEVA V., PAUNOV M., CHEPISHEVA M., KOUSMANOVA M., KALAJI M.H., GOLTSEV V., 2014. *Deficiency of some nutrient elements in bean and maize plants analyzed by luminescent method*. Bulg. J. Agricult. Sci. 20, 24-30.
- ANGELINI G., RAGNI P., ESPOSITO D., GIARDI P., POMPILI M.L., MOSCARDELLI R., GIARDI M.T., 2001. *A device to study the effect of space radiation on photosynthetic organisms*. Physica Medica 17 (Suppl. 1), 267-268.
- BAKER N. R., ROSENQVIST E., 2004. *Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities*. J. Exp. Bot. 55, 1607-1621.
- BORAWSKA-JARMUJŁOWICZ B., MASTALERCZUK G., PIETKIEWICZ S., KALAJI M. H., 2014. *Low temperature and hardening effects on photosynthetic apparatus efficiency and survival of forage grass varieties*. Plant Soil Environ. 60, 177-183.
- CAI S. Q., XU D. Q., 2002. *Light intensity-dependent reversible down-regulation and irreversible damage of PSII in soybean leaves*. Plant Sci. 163, 847-853.
- CETNER M. D., PIETKIEWICZ S., PODLASKI S., WIŚNIEWSKI G., CHOLUJ D., ŁUKASIK I., KALAJI M. H., 2014. *Photosynthetic Efficiency of Virginia Mallow (Sida Hermaphrodita (L.) Rusby) under Differentiated Soil Moisture Conditions*. Int. J. Sust. Water Environ. Syst. 6, 89-95.
- CHEN L. S., LI P., CHENG L., 2009. *Comparison of thermotolerance of sun-exposed peel and shaded peel of „Fuji” apple*. Environ. Exp. Bot. 66, 110-116.
- CORREIA C. M., MOUTINHO PEREIRA J. M., COUTINHO J. F., BJÖRN L. O., TORRES-PEREIRA J. M. G., 2005. *Ultraviolet-B radiation and nitrogen affect the photosynthesis of maize: a Mediterranean field study*. Eur. J. Agron. 22, 337-347.
- DEELL J. R., PRANGE R. K., 1995. *Chlorophyll fluorescence as a potential indicator of controlled-atmosphere disorders in 'Marshall' McIntosh apples*. HortScience 30, 1084-1085.
- DEMMIG-ADAMS B., ADAMS III W. W., LOGAN B. A., VERHOEVEN A. S., 1995. *Xanthophyll cycle - dependent energy dissipation and flexible photosystem II efficiency in plants acclimated to light stress*. Austr. J. Plant Physiol. 22, 249-260.
- FIGUEROA F. L., CONDE-ÁLVAREZ R., GÓMEZ I., 2003. *Relations between electron transport rates determined by pulse amplitude modulated chlorophyll fluorescence and oxygen evolution in macroalgae under different light conditions*. Photosynth. Res. 75, 259-275.
- GENTY B., BRIANTAIS J. M., BAKER N. R., 1989. *The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence*. Biochim. Biophys. Acta 990, 87-92.
- GWOREK B., DĄBROWSKI P., PONIECKA B., WRZOSEK J., 2011. *Effect of road traffic on soil and plant contamination with mercury*. Przemysł Chemiczny 90, 267-270.
- JALINK H., VAN DER SCHOOR R., FRANDAS A., VAN PIJLEN J. G., 1998. *Chlorophyll fluorescence of Brassica oleracea seeds as a non-destructive marker for seed maturity and seed performance*. Seed Sci. Res. 8, 437-443.
- JANECZKO A., KOŚCIELNIAK J., PILIPOWICZ M., SZAREK-ŁUKASZEWSKA G., SKOCZOWSKI A., 2005.

- Protection of winter rape photosystem 2 by 24-epibrassinolide under candium stress.* Photosynthetica 43, 293-298.
- KALAJI H. M., 2011. *Oddziaływanie abiotycznych czynników stresowych na fluorescencję chlorofilu w roślinach wybranych odmian jęczmienia Hordeum vulgare L.* Wydawnictwo SGGW, Warszawa.
- KALAJI H. M., NALBORCZYK E., 1991. *Gas exchange of barley seedlings growing under salinity stress.* Photosynthetica 25, 197-202.
- KALAJI H. M., PIETKIEWICZ S. 1993. *Salinity effects on plant growth and other physiological processes.* Acta Physiologiae Plantarum 15, 89-124.
- KALAJI H. M., RUTKOWSKA A., 2004. *Reakcje aparatu fotosyntetycznego siewek kukurydzy na stres solny.* Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych 496, 545-558.
- KALAJI H. M., GUO P., 2008. *Chlorophyll fluorescence: a useful tool in barley plant breeding programs.* [W:] Photochemistry Research Progress. SÁNCHEZ A., GUTIERREZ S. J. (red.). Nova Science Publishers, New York, 439-463.
- KALAJI H. M., ŁOBODA T., 2010. *Fluorescencja chlorofilu w badaniach stanu fizjologicznego roślin.* Wydawnictwo SGGW, Warszawa.
- KALAJI H. M., OUKARROUM A., ALEXANDROV V., KOZMANOVA M., BRESTIC M., ZIVČAK M., SAMBORSKA I. A., CETNER M. D., ALLAKHVERDIEV S. I., GOLTSEV V., 2014a. *Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by in vivo chlorophyll a fluorescence measurements.* Plant Physiol. Biochem. 81, 16-25.
- KALAJI H. M., SCHANSKER G., LADLE R. J., GOLTSEV V., BOSA K., ALLAKHVERDIEV S. I., BRESTIC M., BUSSOTTI F., CALATAYUD A., DĄBROWSKI P., ELSHEERY N. I., FERRONI L., GUIDI L., HOGEWONING S. W., JAJOO A., MISRA A. N., NEBAUER S. G., PANCALDI S., PENELLA C., POLI D. B., POLLASTRINI M., ROMANOWSKA-DUDA Z. B., RUTKOWSKA B., SERÓDIO J., SURESH K., SZULC W., TAMBUSI E., YANNICARI M., ZIVČAK M., 2014b. *Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues.* Photosynth. Res. 122, 121-158.
- KAUTSKY H., HIRSCH A., 1931. *Neue Versuche zur Kohlensaureassimilation.* Naturwissenschaften 19, 96.
- LICHTENTHALER H. K., 2007. *Biosynthesis, accumulation and emission of carotenoids, α - tocopherol, plastoquinone, and isoprene in leaves under high photosynthesis irradiance.* Photosynth. Res. 92, 163-179.
- MATTHEIS J., RUDELL D., 2011. *Responses of 'd'Anjou' pear (Pyrus communis L.) fruit to storage at low oxygen setpoints determined by monitoring fruit chlorophyll fluorescence.* Postharv. Biol. Technol. 60, 125-129.
- MAXWELL K., JOHNSON N. G., 2000. *Chlorophyll fluorescence - a practical guide.* J. Exp. Bot. 51, 659-668.
- MORENO-OSTOS E., CRUZ-PIZARRO L., BASANTA-ALVÉS A., ESCOT C., GEORGE D. G., 2006. *Algae in the motion: Spatial distribution of phytoplankton in thermally stratified reservoirs.* Limnetica, 25, 205-216.
- MURKOWSKI A., 2002. *Oddziaływanie czynników stresowych na luminescencję chlorofilu w aparacie fotosyntetycznym roślin uprawnych.* Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, Lublin.
- OSZAKO T., KALAJI H. M., GĄSZCZYK K., KUBIAK K., 2009. *Alternatywne metody ochrony sadzonek w szkółkach.* Notatnik naukowy Instytutu Badawczego Leśnictwa 7, 4.
- QIAN H., LI J., SUN L., CHEN W., SHENG G. D., LIU W., FU Z., 2009. *Combined effect of copper and candium on chlorella vulgaris growth and photosynthesis - related gene transcription.* Aqu. Toxicol. 94, 56-61.
- ROMANOWSKA E., WRÓBLEWSKA N., DROŻAK A., SIEDLECKA M., 2006. *High light intensity protects photosynthetic apparatus of pea plants against exposure to lead.* Plant Physiol. Biochem. 44, 387-394.
- STANKIEWICZ D., 2007. *Skutki suszy w rolnictwie polskim.* Infos 6, 1-4.
- STRASSER R. J., SRIVASTAVA A., TSIMILI-MICHAEL M., 2000. *The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples, probing photosynthesis.* [W:] Mechanism, Regulation and Adaptation. YUNUS M., PATHRE U., MOHANTY P. (red.). Taylor and Francis, London, 443-480.
- STRASSER R. J., TSIMILI-MICHAEL M., SRIVASTAVA A., 2004. *Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient.* [W:] Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration Series. PAPAGEORGIOU G. C., GOVINDJEE (red.). Springer, Dordrecht, Netherlands, 321-362.
- STRIHZ I. G., LYSENKO G. G., NEVEROV K. V., 2005. *Photoreduction of molecular oxygen in preparation of photosystem II under photoinhibitory conditions.* Rus. J. Plant Physiol. 52, 717-723.
- SWOCZYNA T., KALAJI H. M., PIETKIEWICZ S., BOROWSKI J., ZARAS-JANUSZKIEWICZ E., 2010a. *Monitoring young urban trees tolerance to roadside conditions by application of chlorophyll fluorescence technique.* Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych 545, 303-309.
- SWOCZYNA T., KALAJI H. M., PIETKIEWICZ S., BOROWSKI J., ZARAS-JANUSZKIEWICZ E., 2010b. *Photosynthetic apparatus efficiency of eight tree taxa as an indicator of their tolerance to urban environments.* Dendrobiology 63, 65-75.
- SWOCZYNA T., KALAJI H. M., PIETKIEWICZ S., BOROWSKI J., 2015. *Ability of various tree species to acclimation in urban environments probed with the JIP-test.* Urban Forestry Urban Greening 14, 544-553.
- WEISS O., REIGOSA R. M. R., 2003. *Modulated Fluorescence.* [W:] Handbook of plant ecophysiology techniques. ROGER M. J. (red.). Kluwer Academic Publishers, 173-185.
- YANG X., LIANG Z., WEN X., LU C., 2008. *Genetics engineering of the biosynthesis of glycinebetaine leads to increased tolerance of photosynthesis to salt stress in transgenic tobacco plants.* Plant Mol. Biol. 66, 73-86.
- ZIELINSKI O., BUSH J. A., CEMBELLA A. D., DALY K. L., ENGELBREKTSSON J., HANNIDES A. K., SCHMIDT H., 2009. *Detecting marine hazardous substances and organisms: sensor for pollutants, toxins, and pathogens.* Ocean Sci. 5, 329-349.
- ŽIVČAK M., BRESTIČ M., OLŠOVSKÁ K., SLAMKA P., 2008. *Performance index as a sensitive indicator of water stress in Triticum aestivum L.* Plant Soil Environ. 54, 133-139.
- ŽIVČAK M., OLŠOVSKÁ K., SLAMKA P., GALAMBOŠOVÁ J., RATAJ V., SHAO H.-B., KALAJI H. M., BRESTIČ M., 2014. *Measurements of chlorophyll fluorescence in different leaf positions may detect nitrogen deficiency in wheat.* Zemdirbyste Agricult. 101, 437-444.

KOSMOS Vol. 65, 2, 197–205, 2016

CHLOROPHYLL FLUORESCENCE MEASUREMENTS IN ENVIRONMENTAL STUDIES

HAZEM M. KALAJI¹, MAGDALENA D. CETNER¹, PIOTR DĄBROWSKI², IZABELA A. SAMBORSKA¹, IZABELA ŁUKASIK¹, TATIANA SWOCZYNA³, STEFAN PIETKIEWICZ¹, WOJCIECH BABA⁴

¹Department of Plant Physiology, ²Department of Environmental Improvement, ³Department of Environmental Protection, Warsaw University of Life Sciences, Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa, ⁴Department of Plant Ecology, Institute of Botany Jagiellonian University, Lubicz 46, 31-512 Krakow, E-mail: piotr.andrzej.dabrowski@gmail.com, wojciech.baba@uj.edu.pl

Summary

The aim of this paper is to inform the readers about some possibilities of applying chlorophyll fluorescence measurements in studies of plants' condition under abiotic stress. We present basic knowledge on chlorophyll fluorescence emission and measuring techniques of prompt fluorescence, pulse amplitude modulated fluorescence, and the OJIP test. Special emphasis is placed on chlorophyll fluorescence parameters obtained from each measuring technique and their relevance to functioning of photosynthetic machinery and the whole process of photosynthesis. The influence of selected abiotic factors on chlorophyll fluorescence is described, focusing on the photosynthetic active radiation, temperature, drought, soil salinity, mineral deficiencies, and heavy metals. The paper presents also some of unusual applications of chlorophyll fluorescence measurements, such as testing of fruit maturity, seed vigor, or monitoring of aquatic ecosystems. In the summary, we highlight that measurements of chlorophyll fluorescence provide an universal tool for a quick evaluation and analysis of the effects of various unfavorable environmental conditions on the efficiency of photosynthesis.