

Antoni Murkowski

Akademia Rolnicza w Szczecinie, Zakład Fizyki

Oddziaływanie spermidyny na reakcje świetlne fotosyntezy roślin rzepaku oraz podwyższenie ich odporności na stres wodny

Effect of spermidine on light reactions of photosynthesis in oilseed rape plants and enhancement of their water stress resistance

Słowa kluczowe: fluorescencja chlorofilu, fotosynteza, rzepak, spermidyna, stres wodny

Key words: chlorophyll fluorescence, photosynthesis, oilseed rape, spermidine, water stress

Badano wpływ dolistnie zaaplikowanej spermidyny (10 mM) na przebieg reakcji fotosyntezy w młodych liściach rzepaku odmiany Marita. W tym celu wyznaczono parametry indukcji fluorescencji chlorofilu (F_0 , F_v/F_0 i Rfd) oraz współczynnik wygaszania fotochemicznego (qP) i całkowitą wydajność kwantową PSII (Y) w liściach rzepaku poddanych i nie poddanych działaniu spermidyny. Uzyskane wyniki wskazują, że w ten sposób wprowadzona spermidyna zmniejszyła od 2% do około 21% efektywność badanych reakcji fazy świetlnej fotosyntezy. Parametry te określono również dla fragmentów liści poddanych odwodnieniu (RWC około 16%) oraz po ich 24-godzinnej restytucji. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że liście wzbogacone w spermidynę, zarówno w warunkach silnego stresu wodnego, jak i po fazie restytucji, wykazują istotnie wyższą efektywność reakcji fazy świetlnej fotosyntezy w porównaniu z liśćmi nie poddanymi działaniu suszy.

The study focused on the influence of spermidine (10 mM) on light reactions of photosynthesis in young leaves of oilseed rape cv. Marita. The parameters of chlorophyll fluorescence induction (F_0 , F_v/F_0 and Rfd), the coefficient of photochemical quenching (qP) and total quantum efficiency of the PSII (Y) were measured in leaves non-treated and treated with spermidine. The results indicate that spermidine decreased the efficiency of the studied reaction in the light phase of photosynthesis by 2% to about 21%. The fluorescence parameters were also determined for dehydrated leaf fragments (RWC approx. 16%) as well as after their 24-hour restitution. The results allow to conclude that spermidine-enriched leaves have higher photosynthesis efficiency both under heavy water stress and after restitution in comparison with the leaves that were not dehydrated.

Wstęp

Poliaminy znajdują się w komórkach wszystkich żywych organizmów spełniając wiele funkcji o charakterze regulacyjnym oraz ochronnym (Tabor

i Tabor 1984, Drolet i in. 1986, Niklas i in. 1998). Z tego też względu, mechanizmy działania tych związków w roślinach są przedmiotem szeroko zakrojonych badań przy użyciu metod biochemicznych i genetycznych (Evans i Malmberg 1989, Galston i Sawhney 1990, Bouchereau i in. 1999). Szczególnie obiecujące są wyniki badań nad ochronną rolą poliamin w komórkach roślin poddanych działaniu różnorodnych czynników stresowych, a także nad rolą tych związków w aklimatyzacji oraz adaptacji roślin do zmieniających się warunków środowiska (Kubiś i Bandurska 1997, Bouchereau i in. 1999, Czerpak i Bajguz 1999). Spermidyna, podobnie jak i inne poliaminy zwiększa stabilność błon biologicznych, a tym samym podwyższa odporność roślin na szereg stresów, niestety w większych stężeniach oddziałuje również hamująco na reakcje fazy świetlnej fotosyntezy (Cohen i in. 1979, Floryszak-Wieczorek i in. 1992). W badaniach wpływu czynników stresowych na fotosyntezę bardzo przydatne są metody fluorymetryczne, a szczególnie pomiary wygaszania fluorescencji oraz analiza krzywej indukcji fluorescencji chlorofilu (Lichtenthaler i Rinderle 1988, Schapendonk i in. 1989, Ögren 1990, Schreiber i in. 1994, Murkowski 1999).

Celem podjętej pracy było zbadanie jak w warunkach stresu wodnego zmienia się efektywność reakcji fotosyntezy w jej fazie świetlnej oraz w jakim stopniu zaaplikowana dolistnie spermidyna chroni prawidłowe funkcje chloroplastów w odwodnionych tkankach liści rzepaku.

Material i metody

Rośliny rzepaku odmiany Marita rosły 15 dni w termoluminostacie na podłożu piaskowym, podlewanym 50% roztworem pożywki z mikroelementami wg Hoaglanda (Johnson i in. 1957), w temperaturze dnia i nocy 18°C/15°C i fotoperiodzie 12 h. Źródłem światła były lampy rtęciowe LRFR 400 zapewniające PPFd (gęstość strumienia fotonów fotosyntetycznie aktywnych) ok. 180 $\mu\text{mol fotonów m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, co odpowiada około 40 $\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$ (PAR). Z pierwszych liści ośmiu badanych roślin rzepaku pobrano 8 krążków o średnicy 9 mm, które poddano działaniu spermidyny. Z tych samych liści pobrano również 8 krążków stanowiących próbę kontrolną. Krążki przed pomiarami inkubowano przy umiarkowanym świetle (PPFD 100 $\mu\text{mol fotonów} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) przez 20 godzin na powierzchni 10 mM roztworu spermidyny (oznaczone jako Spm) lub na powierzchni wody (kontrola — K). Do badań użyto spermidyny firmy Merck.

Przy pomocy uniwersalnego fluorymetru (własna konstrukcja) wykonano pomiary indukcji fluorescencji chlorofilu *a* i wyznaczono parametry F_0 , F_v/F_0 i Rfd (Lichtenthaler i Rinderle 1988, Murkowski 1999). Przy użyciu fluorymetru impulsowego PAM 200 firmy Walz wyznaczono maksymalną wydajność kwantową fotosystemu II (F_v/F_M), współczynnik wygaszania fotochemicznego (qP), oraz całkowitą wydajność kwantową PSII (Y) — (Schreiber i in. 1994).

Po wykonanych pomiarach (I cykl) krążki liściowe były powietrznie suszone aż do osiągnięcia RWC około 16%, po czym wszystkie pomiary powtórzone (II cykl). Następnie krążki poddano restytucji umieszczając je na powierzchni wody destylowanej (temperatura pokojowa, słabe rozproszone światło). Po 24 h krążki osuszono i zważono. Wszystkie one osiągnęły masę zbliżoną do początkowej (+8%, -12%). Następnie wykonano pomiary parametrów fluorescencji (III cykl).

Pomiary wykonywano w 8 powtórzeniach, a wyniki przedstawiono w tabeli 1 i na diagramach jako wartości średnich arytmetycznych. Na podstawie analizy wariancji porównano pary średnich i przy pomocy testu t Studenta obliczono najmniejsze różnice istotne, które oznaczono: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

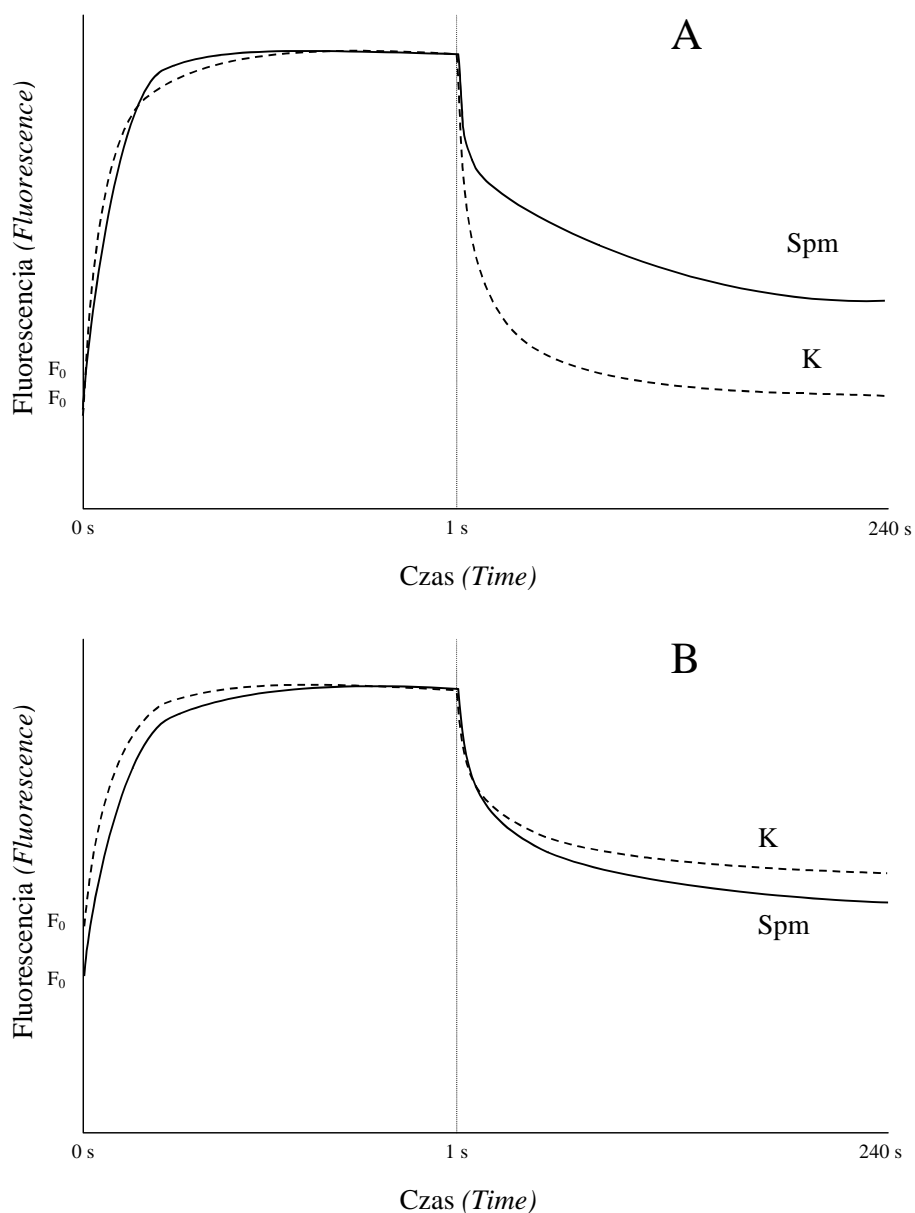
Tabela 1

Wartości parametrów fluorescencji chlorofilu liści kontrolnych (K) oraz wzbogaconych w spermidynę (Spm) — *Parameters of chlorophyll fluorescence of control leaves (K) and spermidine-fed leaves (Spm)*

	F_V/F_M	F_V/F_0	qP	Y	Rfd
K	0,768	3,33	0,872	0,622	2,38
Spm	0,751	2,95	0,800	0,546	1,88
NIR — LSD	0,017*	0,22**	0,051*	0,035**	0,26**

Wyniki i dyskusja

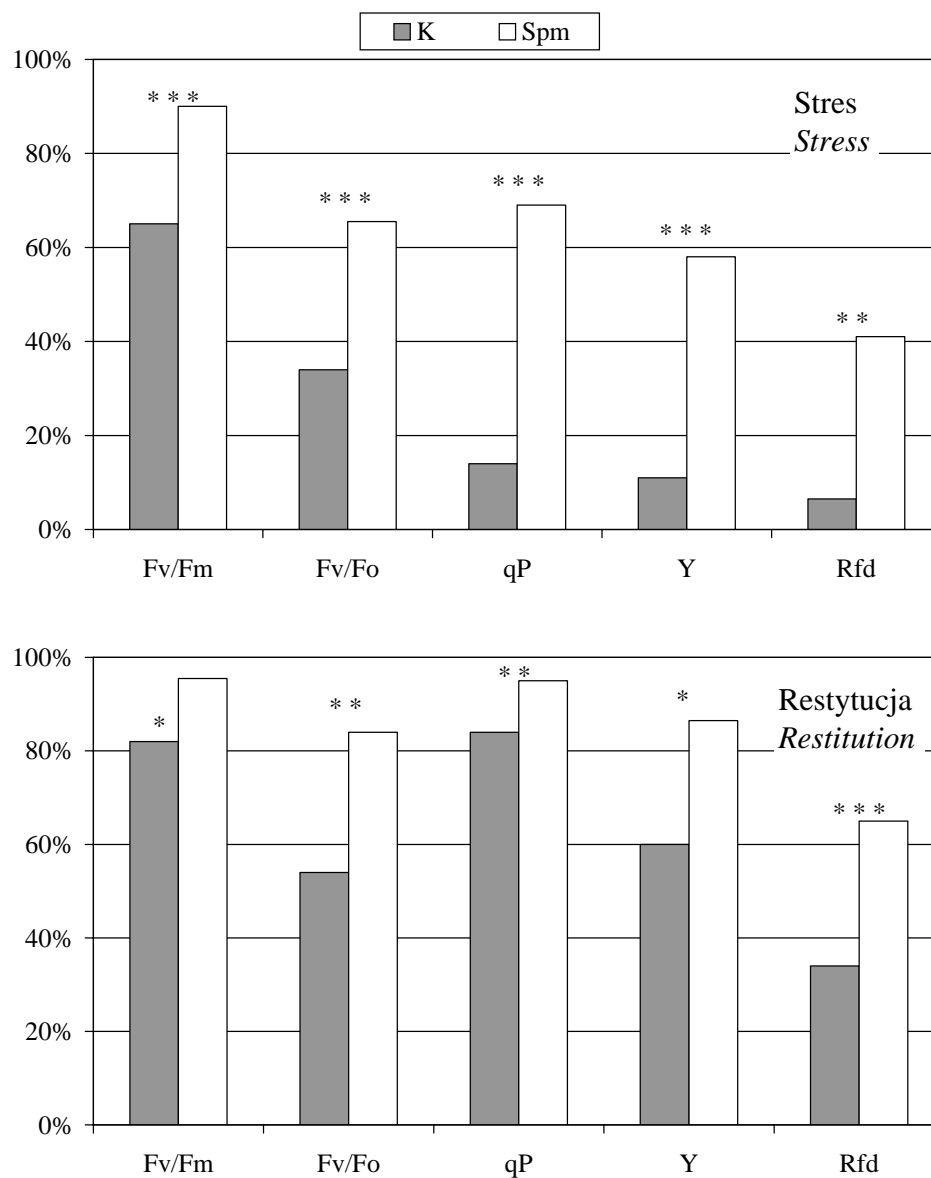
Na rys. 1A przedstawiono uśrednione przebiegi indukcji fluorescencji chlorofilu w krążkach liściowych z grupy Spm (traktowanych spermidyną) oraz K (bez spermidyny). Z porównania obu krzywych wynika, że egzogennie wprowadzona spermidyna nie zmniejszyła w sposób istotny efektywności przekazywania energii wzbudzenia z obszaru chlorofilowej anteny energetycznej do centrum reakcji PSII, bowiem wartości fluorescencji zerowej (F_0) w obu seriach były zbliżone. Wartości pozostałych parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu (F_V/F_0 i Rfd) oraz parametrów wyznaczonych techniką impulsów nasycających (F_V/F_M , qP i Y) przy użyciu fluorymetru PAM 200 prod. firmy Walz, zestawiono w tabeli 1. Z analizy tych danych wynika, że spermidyna w niewielkim stopniu obniżyła maksymalną wydajność kwantową PSII (parametr F_V/F_M), ale wyraźnie obniżyła efektywność reakcji rozkładu wody przez kompleks zlokalizowany na stronie donorowej tego samego fotosystemu (parametr F_V/F_0). Miało to z pewnością wpływ na podobne kilkunastoprocentowe obniżenie całkowitej wydajności kwantowej procesu konwersji energii w PSII (parametr Y).



A — przed stresem wodnym — *before water stress*

B — po ich odwodnieniu — *after dehydration of leaf discs*

Rys. 1. Uśrednione krzywe fluorescencji chlorofilu w liściach rzepaku bez spermidyny (K — grupa kontrolna) i po zaaplikowaniu spermidyny (Spm) — *Averaged chlorophyll fluorescence curves of oilseed rape leaves without spermidine (control — K) and after spermidine application (Spm)*



Rys. 2. Porównanie względnych wartości parametrów fluorescencji wyznaczonych dla liści rzepaku bez spermidyny (grupa kontrolna — K) i po dolistnym zaaplikowaniu spermidyny (Spm), w warunkach odwodnienia (Stres) oraz po jednodobowej restytucji (Restytucja) — Comparison of relative values of fluorescence parameters estimated for oilseed rape leaves without spermidine (control — K) and after spermidine application (Spm), under dehydration stress (Stress) and after 24-hour restitution (Restitution)

Niewielki spadek wartości współczynnika wygaszania fotochemicznego (qP) jest skutkiem nieco spowolnionego utleniania pierwotnego chinonowego akceptora elektronu (Q_A) w PSII przez plastochinon. Pod wpływem spermidyny w największym stopniu obniżyła się wartość wskaźnika witalności (Rfd), będącego miernikiem zrównoważonego współdziałania reakcji fotochemicznych z enzymatycznymi reakcjami fazy ciemnej — cyklem Calvina (Lichtenthaler i Rinderle 1988). Można przypuszczać, że oprócz umiarkowanego spowolnienia reakcji w obszarze PSII, nastąpiło również zakłócenie w produkcji czynnika redukującego NADPH przez PSI. Potwierdziłoby to wyniki wcześniejszych prac dotyczących negatywnego wpływu spermidyny oraz innych poliamin na aktywność fotochemiczną PSI w chloroplastach jęczmienia (Cohen i in. 1979, Popovic i in. 1979), a także obniżenie o około 15% wartości Rfd w liściach pszenicy poddanych przez 24 godziny działaniu 4 mM roztworu spermidyny (Floryszak-Wieczorek i in. 1992).

Po odwodnieniu badanych krążków liściowych do RWC około 16%, relacje między wartościami parametrów prób Spm i K zmieniły się w sposób zasadniczy (rys. 1 i rys. 2). Dehydratacja spowodowała w obu przypadkach wzrost wartości parametru F_0 , spowodowany wzrostem strat podczas przekazywania energii z chlorofilowej anteny do centrum reakcji PSII. Gdy jednak średni wzrost wartości F_0 obliczony dla próby Spm (w porównaniu z odpowiednią wartością obliczoną dla krążków przed odwodnieniem) był wyższy o 53%, to dla kontroli przyrost ten wyniósł aż 90%. Przyrosty te można oszacować porównując krzywe fluorescencji na rys. 1A i 2B, dane liczbowe nie zostały na rysunkach uwzględnione. Diagramy w górnej części rysunku 2, oznaczone „Stres”, przedstawiają względne obniżenie wartości wszystkich wyznaczonych uprzednio parametrów. Wartość danego parametru uzyskana dla krążka liściowego po odwodnieniu (II cykl) dzielono przez wartość tego samego parametru wyznaczonego przed odwodnieniem (I cykl), a otrzymany iloraz mnożono przez 100%. Takie wyliczenia dokonano dla wszystkich krążków, następnie obliczono średnie arytmetyczne ilorazów (osobno dla grupy K i Spm) oraz statystycznie istotne różnice między średnimi. Diagramy zaciemnione przedstawiają uśrednione wartości dla grupy K, a diagramy jasne dla Spm. W analogiczny sposób obliczono i przedstawiono względne wartości parametrów wyznaczonych dla tych samych badanych krążków liściowych po jednodobowej restytucji (wartości parametrów III cyklu dzielono przez wartości I cyklu $\times 100\%$) — dolna część rysunku 2 „Restytucja”.

W warunkach sprowokowanego stresu wodnego wartości wszystkich niemal parametrów dla serii K (z wyjątkiem F_v/F_m) uległy drastycznemu obniżeniu. Świadczy to o zakłóceniach w przebiegu podstawowych funkcji chloroplastów, a szczególnie procesu enzymatycznej redukcji CO_2 (spadek wartości Rfd o 93%). Jednocześnie okazało się, że stabilizujące oddziaływanie spermidyny na błony biologiczne, w warunkach stresu wodnego z nawiązką skompensowało jej uprzednio negatywny wpływ na przebieg reakcji fotosyntezy. Egzogennie

zaaplikowana spermidyna pozwoliła utrzymać na dosyć wysokim poziomie, całkowitą wydajność kwantową fotosystemu II (wartość parametru Y około 60% wartości z I cyklu) oraz na dostatecznym poziomie (około 40% z I cyklu) wartość wskaźnika witalności Rfd.

Znaczny wzrost względnych wartości parametrów po okresie restytucji (rys. 2 „Restytucja”) wskazuje, że silne zakłócenia reakcji fotochemicznych w grupie kontrolnej K, okazały się w dość dużym stopniu odwracalne. Jedyne wartości wskaźnika Rfd, związanego z prawidłowym przebiegiem reakcji w ciemnej fazie fotosyntezy, osiągnęła zaledwie 33% wartości początkowej. Wynik ten zdaje się potwierdzać wcześniejsze spostrzeżenia dotyczące wpływu dehydratacji na obniżenie aktywności enzymatycznej karboksylazy RuBP w chloroplastach (Castrillo i Calcagno 1989). W grupie Spm efekt restytucji był dla wszystkich parametrów w istotnym stopniu lepszy niż dla analogicznych parametrów grupy K, jednak i tutaj średnia wartość wskaźnika Rfd osiągnęła tylko 64% wartości początkowej.

Niewątpliwie znaczące działanie ochronne spermidyny na prawidłowy przebieg reakcji fotosyntezy w warunkach silnej dehydratacji liści rzepaku oraz ewidentna poprawa efektów restytucji może być wskazówką przy hodowli odpornościowej. Ogromne, potencjalne możliwości, jakimi dysponuje inżynieria genetyczna, pozwalają przewidywać, że już w bliskiej przyszłości nastąpi wielokierunkowe ulepszanie genomów roślin uprawnych. Należałoby rozważyć, czy powiększenie na tej drodze ilości endogennych poliamin w roślinach mogłoby podwyższyć ich naturalną odporność na różnorodne stresy środowiska.

Wnioski

1. Zastosowana dolistnie spermidyna w stężeniu 10 mM w niewielkim, ale istotnym stopniu obniżyła wartości wyznaczonych parametrów fluorescencji, co jest związane ze zmniejszoną efektywnością reakcji fazy świetlnej fotosyntezy w badanych liściach rzepaku.
2. W warunkach deficytu wody wartości wszystkich parametrów fluorescencji uległy obniżeniu, jednakże w liściach wzbogaconych w spermidynę obniżenie to było zdecydowanie mniejsze niż w liściach kontrolnych, co świadczyć może o stabilizującym oddziaływaniu spermidyny na fotosyntetyczną aktywność chloroplastów podczas stresu suszy.
3. Wzbogacenie liści w spermidynę zwiększa istotnie efektywność świetlnej fazy fotosyntezy po stresie suszy i jednodobowej restytucji, w porównaniu do liści kontrolnych.

Literatura

- Bouchereau A., Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J. 1999. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci.* 140: 103-125.
- Castrillo M., Calcalgno A.M. 1989. Effects of water stress and rewatering on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity, chlorophyll and protein content in two cultivars of tomato. *J. Hort. Sci.* 64: 717-724.
- Cohen A.S., Popovic R.B., Zalik S. 1979. Effect of polyamines on chlorophyll and protein content photochemical activity and chloroplast ultrastructure of barley leaf discs during senescence. *Plant Physiol.* 64: 717-720.
- Czepak R., Bajguz A. 1999. Aktywność fizjologiczno-biochemiczna poliamin w adaptacji roślin do stresów. *Post. Biol. Komórki* 26 (3): 523-538.
- Drolet G., Dumbroff E.B., Legge L.R., Thompson J.E. 1986. Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry* 25 (2): 367-371.
- Evans P.T., Malmberg R.L. 1989. Do polyamines have role in plant development? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecul. Biol.* 40: 237-269.
- Floryszak-Wieczorek J., Murkowski A., Kubiś J., Krzywański Z. 1992. The effect of spermidine on chlorophyll luminescence in wheat leaves under water stress. *Acta Physiol. Plant.* 14 (3): 119-126.
- Galston A.W., Sawhney R.K. 1990. Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol.* 94: 406-410.
- Johnson C.M., Stout P.R., Broyer T.C., Carlton A.B. 1957. Comparative chlorine requirements of different plant species. *Plant and Soil*, 8: 337-353.
- Kubiś J., Bandurska H. 1998. Zmiany zawartości poliamin w liściach dwóch genotypów jęczmienia w warunkach stresu wodnego. W: *Ekofizjologiczne aspekty reakcji roślin na działanie abiotycznych czynników stresowych*. Edytorzy: St. Grzesiak, A. Skoczowski, Z. Miszański, ZFR PAN Kraków: 209-212.
- Lichtenthaler H., Rinderle U. 1988. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 19 (1): S29-S85.
- Murkowski A. 1999. Badanie termowrażliwości roślin rzepaku. *Rośliny Oleiste XX*: 387-394.
- Niklas A., Butowt R., Jazdzewska E., Majewska-Sawka A. 1998. Poliaminy w komórce roślinnej: synteza, mechanizmy działania i funkcje. *Post. Biol. Komórki* 25 (1): 33-49.
- Ögren E. 1990. Evaluation on chlorophyll fluorescence as a probe for drought stress in willow leaves. *Plant Physiol.* 93: 1280-1285.
- Popovic R.B., Kyle D.J., Cohen A.S., Zalik S. 1979. Stabilization of thylakoid membranes by spermine during stress-induced senescence of barley leaf discs. *Plant Physiol.* 64: 721-726.
- Schapendonk A.H.C.M., Spitters C.J.T., Groot P.J. 1989. Effects of water stress on photosynthesis and chlorophyll fluorescence of five potato cultivars. *Potato Research* 32: 17-32.
- Schreiber U., Bilger W., Neubauer C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: *Ecophysiology of photosynthesis* (eds. Schulze E.D. and Caldwell M.M.). *Ecological Studies* 100: 49-70.
- Tabor C.W., Tabor H. 1984. Polyamines. *Annu. Rev. Bioch.* 53: 749-790.