

**Antoni Murkowski**

Akademia Rolnicza w Szczecinie, Zakład Fizyki

## Badanie termowrażliwości roślin rzepaku

### Thermo-susceptibility of oilseed rape plants

Słowa kluczowe: gen *psb A*, indukcja fluorescencji chlorofilu, opóźniona luminescencja chlorofilu, rzepak, termostabilność, triazynoodporność

Key words: chlorophyll delayed luminescence, chlorophyll fluorescence induction, *psb A* gen, oilseed rape, thermosusceptibility, triazine-resistance

Rośliny rzepaku, w których zmutowaniu uległ gen *psb A* odpowiedzialny za syntezę białka D1, związanego z pierwotnym stabilnym akceptorem  $Q_B$  w fotosystemie II, wykazują odporność na herbicydy triazynowe. Tego rodzaju mutacja obniża jednak odporność roślin na niektóre stresy środowiska oraz zmniejsza ich produktywność. W pracy przedstawiono wyniki badań termowrażliwości roślin rzepaku ozimego odmiany Marita oraz triazynoodpornego rodu 7841/li/95 przy użyciu testów luminescencyjnych. Uzyskane wyniki potwierdziły zwiększoną termowrażliwość roślin badanego rodu rzepaku, w porównaniu z roślinami odmiany Marita.

The rape plants with mutated *psb A* gene, coding the synthesis of D1 — the protein connected to the primary acceptor  $Q_B$  of photosystem II — show their resistance to triazine herbicides. The mutation, however, causes the decrease in the plants photosynthetic productivity and deteriorates its resistance to some environmental stresses. This paper presents the results of thermostability estimation for rape plants, cv. Marita and triazine-resistant genotype 7841/li/95, by means of luminescence test. The results demonstrated higher thermo-susceptibility of the examined genotype comparing to the cv. Marita plants.

### Wstęp

Na rośliny uprawne rosnące w warunkach naturalnych oddziałują stresy środowiska, wśród których podwyższona temperatura staje się coraz częściej istotnym czynnikiem zakłócającym funkcje i naruszającym strukturę aparatu fotosyntetycznego. Powodem tego są długotrwałe anomalie pogodowe oraz tendencja do zwiększania udziału upraw pod osłonami. W naszej strefie klimatycznej coraz częściej rejestruje się w okresie wiosennym i letnim temperaturę powietrza powyżej 30°C, np. w rejonie Pomorza Zachodniego w miesiącach intensywnej vegetacji roślin uprawnych (od kwietnia do końca czerwca) maksymalna dobową temperaturą powietrza przekracza wielokrotnie 33°C (Koźmiński i Czarnecka, 1993). Dłuższe okresy zwiększonego nasłonecznienia mogą spowodować, że temperatura tkanek liści przewyższy temperaturę otaczającego powietrza nawet

o 15°C, co może doprowadzić do ich przegrzania (Kreeb 1979). Przegrzaniem określa się przekroczenie optymalnej temperatury (25–30°C) dla roślin naszej strefy klimatycznej o około 10°C (Starck i in. 1995).

Wzrost temperatury wpływa stymulująco na fotooddychanie, co zmniejsza asymilację CO<sub>2</sub> netto. Efekt ten można wytłumaczyć wpływem podwyższonej temperatury na intensyfikację reakcji utleniania kosztem zmniejszonej aktywności reakcji karboksylacji, przeprowadzanej przez karboksylazę rybulozo-1,5-bifosforanową (Brooks, Farquhar 1985; Hall, Rao 1999). Prawidłowy przebieg fotosyntezy jest uwarunkowany zrównoważeniem szybkości reakcji fotochemicznych (konwersji energii świetlnej na syntezę ATP i NADPH) z reakcjami ciemnowymi, w których te produkty zostaną wykorzystane. Wzrost temperatury wpływa na zmianę własności redukcyjno-utleniających akceptorów w PSII oraz szybkość transportu elektronu (Huner i in. 1996). Powoduje to zwiększenie strat energii wzbudzenia poprzez wzmożoną emisję fluorescencji stacjonarnej oraz zmianę wartości parametrów indukcji fluorescencji (Bilger 1984; Daniel 1997).

Zwiększoną podatność na stres termiczny wykazują rośliny posiadające zmutowany gen *pbs A*, odpowiedzialny za syntezę białka D1 (32 kD), związanego z pierwotnym akceptorem elektronów Q<sub>B</sub> w fotosystemie II (Lemoine i in. 1986; Seeman i in. 1984). Mutacja ta zwiększa odporność tych roślin na dużą grupę herbicydów triazynowych, lecz niestety zmniejsza ich produktywność, a także obniża odporność zmutowanych roślin na niektóre stresy środowiska (Murkowski 1995, 1996b; Stanek 1994).

Celem pracy było porównanie efektywności procesów fotochemicznych fotosyntezy i termowrażliwości roślin rzepaku rodu triazynoodpornego z roślinami rzepaku odmiany Marita.

## Material i metody

---

Rośliny rzepaku (*Brassica napus*) odmiany Marita oraz triazynoodpornego rodu 7841/1i/95\* rosły na podłożu piaskowym przy natężeniu napromieniowania PAR 150 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (lampy LRFR 400), fotoperiodzie 12 h, temperaturze 18/15°C odpowiednio w dzień/w nocy, podlewano je pożywką Hoaglanda (50%). Do badań pobierano krążki (Ø 13 mm) wycięte z liścieni ośmiiodniowych roślin oraz z drugiego liścia osiemnastodniowych roślin.

Wykonano pomiary: indukcji fluorescencji chlorofilu na uniwersalnym fluorymetrze sterowanym przez komputer PC z kartą przetwornika A/C firmy Ambex (Murkowski 1995) i wyznaczono następujące parametry:

---

\* Nasiona rodu 7841/1i/95 otrzymano z IHAR Poznań

- $F_v/F_p$  — miara wydajności reakcji fotochemicznych w PSII (Krause, Somersalo 1989),
- $F_v/F_0$  — miara efektywności pracy systemu fotolizy wody na donorowej stronie PSII (Havaux i Lannoye 1984),
- $S_c$  — parametr informujący o puli niezredukowanych akceptorów na stronie redukcyjnej PSII (Lavorel i in. 1986),
- Rfd — wskaźnik witalności, informujący o współdziałaniu reakcji fotochemicznych z enzymatycznymi reakcjami fazy ciemnej (Lichtenthaler i in. 1986);

gdzie:  $F_0$  — fluorescencja zerowa;  $F_p$  — najwyższa osiągnięta fluorescencja (wartość pik);  $F_v = F_p - F_0$  — fluorescencja zmienna;  $Rfd = (F_p - F_s)/F_s$ , gdzie  $F_s$  jest wartością fluorescencji stacjonarnej.

W celu wyznaczenia parametru  $L_d$ , informującego o prędkości transportu elektronu pomiędzy P680 a plastochinonem, rejestrowano zanik opóźnionej luminescencji przy użyciu wysokoczułego luminometru (Murkowski 1987, 1996a).

Zmiany wydajności fluorescencji stacjonarnej w funkcji temperatury (termogram w zakresie od 30 do 70°C) mierzono na uniwersalnym fluorymetrze sterowanym przez komputer PC z kartą przetwornika A/C firmy Ambex (Murkowski 1993).

Fluorescencję stacjonarną wzbudzano wąskim pasmem promieniowania czerwonego (maks. 650 nm) i rejestrowano przez filtr graniczny ( $\lambda > 680$  nm), temperaturę zmieniano z szybkością 0,5°C/15 s w zakresie od 30 do 70°C.

Wyniki przedstawiono na diagramach, w tabeli oraz w postaci termogramów. Wartości pomiarów są średnimi arytmetycznymi z 6 powtórzeń (wykonanych na oddzielnych roślinach). Na podstawie analizy wariancji obliczono najmniejsze istotne różnice (NIR) przy pomocy testu t-Studenta na poziomie istotności 0,05.

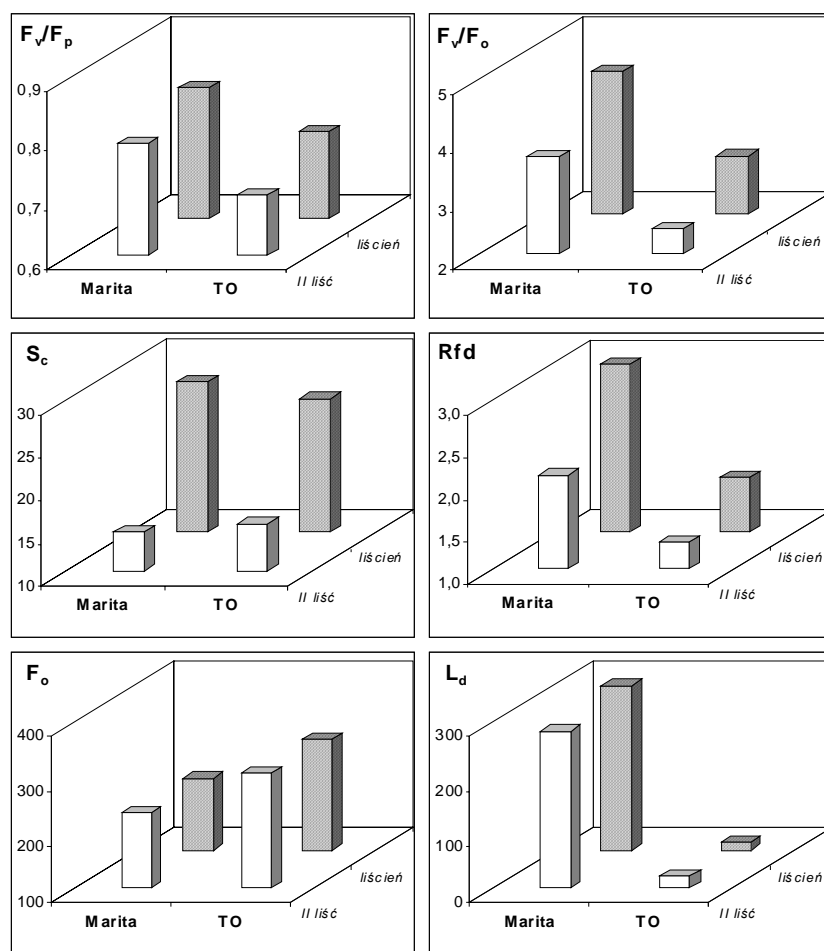
## Wyniki i dyskusja

Przeprowadzone pomiary indukcji fluorescencji oraz opóźnionej luminescencji chlorofilu w tkankach liścieni oraz drugiego liścia obu badanych biotypów rzepaku wykazały podobne zróżnicowanie jak w poprzednich pracach. Zarówno rośliny triazynoodpornej odmiany rzepaku Triton, jak i odporne na triazyny rody rzepaku ozimego, 5972/2/89 i 5971/4/89, otrzymane wcześniej z IHAR w Poznaniu (Murkowski 1995, 1996b), oraz badane rośliny rodu 7841/1i/95 wykazywały gorsze parametry określające efektywność pierwotnych reakcji fotosyntezy (różnice istotne zarówno dla liścieni i liści, z wyjątkiem  $S_c$ ) w porównaniu z analogicznymi parametrami roślin typowych odmian rzepaku. Z parametrów przedstawionych na rysunku 1 jedynie parametr  $S_c$ , określający wielkość puli

plastochinonu zaangażowanej w przekazywanie elektronu od PSII do PSI, nie różnicował roślin odmiany Marita od rodu triazynoodpornego (TO). Należy zwrócić uwagę na mniejszą efektywność procesów fotochemicznych zarówno po stronie akceptorowej ( $F_v/F_p$ ), jak i donorowej ( $F_v/F_0$ ) w PSII roślin TO w porównaniu z roślinami odmiany Marita. Podobną zależność obserwuje się przy porównaniu wskaźnika witalności Rfd, który informuje o zrównoważeniu reakcji fotochemicznych w lamellach z ciemniowymi reakcjami enzymatycznymi, zachodzącymi w stromie chloroplastów (Lichtenthaler i in. 1986). Podwyższona wartość parametru  $F_0$  (fluorescencja zerowa) roślin TO świadczy, że zwiększone są również straty energii wzbudzenia elektronowego w „antenie” PSII. Szczególnie duże różnice można odnotować w wartościach parametru  $L_d$  wyznaczonego zarówno dla liścieni, jak i liści dwóch badanych genotypów roślin. Niska wartość  $L_d$  u roślin TO świadczy, że mutacja genowa jest zlokalizowana w obrębie pierwotnych akceptorów chinonowych, co powoduje istotne zmniejszenie szybkości przekazywania elektronu z  $Q_A$  do  $Q_B$  (Kyle i in. 1984).

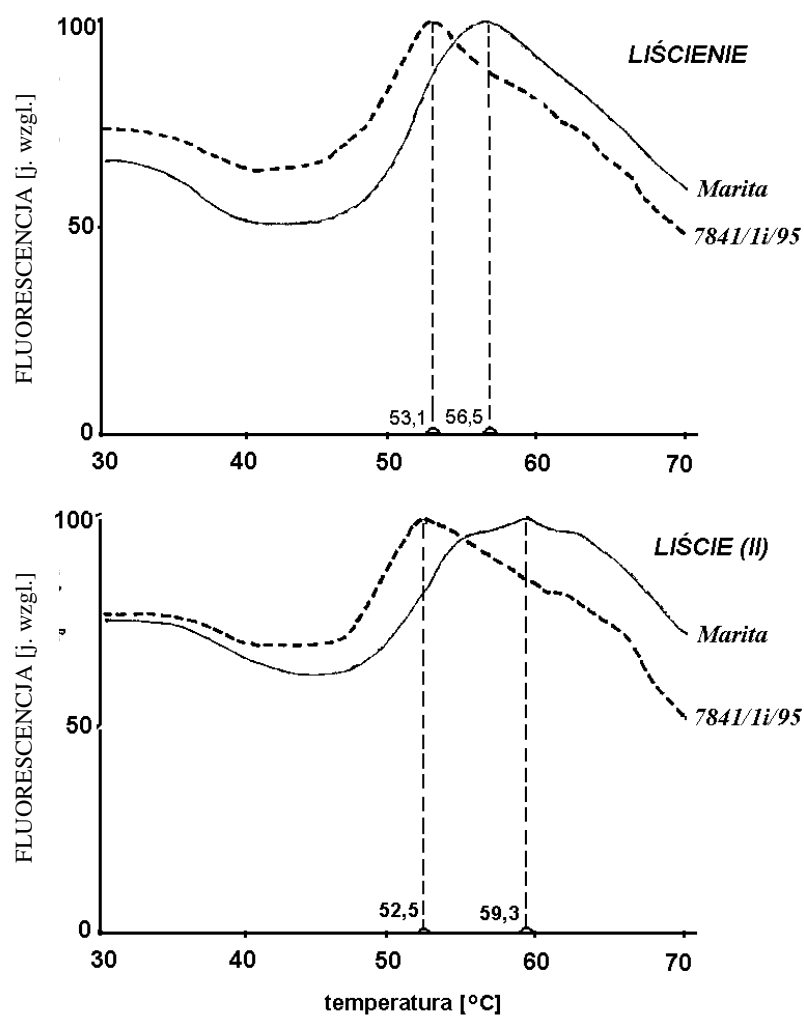
Niektórzy badacze wskazują, że rośliny triazynoodporne charakteryzują się obniżoną termoodpornością (Lemoine i in. 1986). Do oceny odporności na podwyższoną temperaturę badanych roślin wykorzystano test luminescencyjny (Murkowski 1993). Podczas nagrzewania tkanek roślinnych zawierających chlorofil rejestruje się początkowo wzrost natężenia fluorescencji stacjonarnej, spowodowany inaktywacją fotosystemu II, po czym następuje spadek intensywności fluorescencji, spowodowany utrudnionym przekazywaniem energii fotowzbudzenia z kompleksu zbierającego światło do centrum reakcji PSII. Stąd na termogramie pojawia się maksimum w zakresie temperatury  $48\div 61^\circ\text{C}$  (rys. 2 i tab. 1). Podczas dalszego podwyższania temperatury może pojawić się drugie maksimum (lub tylko przecięcie) na krzywej termogramu w zakresie  $58\div 67^\circ\text{C}$ , świadczące o postępującej destrukcji, bardziej odpornego na wysoką temperaturę, kompleksu chlorofilowo-białkowego, związanego z PSI (Schreiber, Berry 1977; Krivoseeva i in. 1992; Ilik i in. 1997).

Położenie maksimum jest uzależnione zarówno od genetycznej odporności rośliny na podwyższoną temperaturę, jak również od jej zdolności do syntezy białek stresu termicznego. Analiza termogramów fluorescencji w zakresie od  $30$  do  $70^\circ\text{C}$  dostarcza cennych informacji o strukturze aparatu fotosyntetycznego i jego niektórych funkcjach, a także może służyć jako szybka metoda oceny odporności odmian, rodów, lub pojedynczych genotypów roślin na stres termiczny (Murkowski 1993).



Rys. 1. Parametry luminescencji chlorofilu liści rzepaku:  $F_v/F_p$  — miara wydajności reakcji fotochemicznych w PSII;  $F_v/F_0$  — miara efektywności pracy systemu fotolizy wody na donorowej stronie PSII;  $S_c$  — parametr informujący o puli niezredukowanych akceptorów na stronie redukcyjnej PSII;  $R_{fd}$  — wskaźnik vitalności informujący o współdziałaniu reakcji fotochemicznych z enzymatycznymi reakcjami fazy ciemnej, gdzie:  $F_0$  — fluorescencja zerowa;  $F_p$  — najwyższa osiągnięta fluorescencja (wartość pik);  $F_v = F_p - F_0$  — fluorescencja zmienna;  $R_{fd} = (F_p - F_s) / F_s$ , gdzie  $F_s$  jest wartością fluorescencji stacjonarnej

*Parameters of chlorophyll luminescence of rape plants:  $F_v/F_p$  — the coefficient of photochemical reaction efficiency in PSII;  $F_v/F_0$  — the coefficient determining the functioning of water-splitting system on the donor side of PSII;  $S_c$  — parameter informing about the pool of electron acceptors in PSII;  $R_{fd}$  — vitality index, informs about the interaction and equilibrium between primary photosynthetic reactions and dark enzymatic reactions, where:  $F_0$  — minimal fluorescence;  $F_p$  — highest attained fluorescence;  $F_v = F_p - F_0$  — variable fluorescence;  $R_{fd} = (F_p - F_s) / F_s$ , where  $F_s$  is fluorescence in steady state*



Rys. 2. Termogramy fluorescencji chlorofilu liścieni (górną) i liści (dół) po ich uśrednieniu i znormalizowaniu — Thermograms of chlorophyll fluorescence of cotyledons (upper) and leaves (down) after their meaning and normalising

Tabela 1

Ocena termoodporności na podstawie termogramów przedstawionych na rysunku 2  
*Estimation of thermostability on the basis of thermograms presented on the fig. 2.*

Rzepak ozimy — <i>Oilseed rape</i>	Marita	Ród — <i>Line 7841/1i/95</i>
Liścienie — <i>Cotyledons</i>	56,5 ± 0,6°C	53,1 ± 0,5°C
	NIR — <i>LSD</i> = 0,7°C	
Liście (II) — <i>Leaves (II)</i>	59,3 ± 1,1°C	52,5 ± 0,5°C
	NIR — <i>LSD</i> = 1,1°C	

## Wnioski

1. Rośliny rzepaku rodu triazynoodpornego charakteryzują się mniej efektywnym przebiegiem fotochemicznych reakcji fotosyntezy, w porównaniu z roślinami rzepaku odmiany Marita.
2. W obu badanych grupach genotypowych liścienie odznaczają się wyższą, w porównaniu z liśćmi, efektywnością pierwotnych reakcji fotosyntezy.
3. Rośliny rzepaku triazynoodpornego rodu 7841/1i/95 wykazywały wyższą termowrażliwość, w porównaniu z roślinami rzepaku odmiany Marita.

## Literatura

- Bilger H.W., Schreiber U., Lange O.L. 1984. Determination of leaf heat resistance: comparative investigation of chlorophyll fluorescence changes and tissue necrosis methods. *Oecologia* (Berlin), 63: 256-262.
- Brooks A., Farquhar G.D. 1985. Effect of temperature on the CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration on the light. *Planta*, 165: 397-406.
- Daniel E. 1997. The temperature dependence of photoinhibition in leaves of *Phaseolus vulgaris* (L.). *Plant Sci.*, 124: 1-8.
- Hall D.O., Rao K.K. 1999. *Fotosynteza*. WNT, Warszawa: 152-156.
- Havaux M., Lannoye R. 1984. Effects of chilling temperatures on prompt and delayed chlorophyll fluorescence in maize and barley leaves. *Photosynthetica*, 18 (1): 117-127.
- Huner N.P.A., Maxwell D.P., Gray G.R., Savitch L.V., Krol M., Ivanov A.G., Falk S. 1996. Sensing environmental temperature change through imbalances between energy supply and energy consumption: Redox state of photosystem II. *Physiol. Plant*, 98: 358-364.

- Ilik P., Naus J., Spunda V., Cajanek M., Cikanek D., Pospisil P. 1997. High temperature chlorophyll fluorescence rise within 61-67°C. Spectroscopic study with intermittent light grown barley leaves. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 39 (3): 243-248.
- Koźmiński C., Czarnecka M. 1993. Klimat miasta Szczecina i okolicy. W: Stan środowiska miasta i rejonu Szczecina. ESOFI Szczecin.
- 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.
- Kreeb K. 1979. *Ekofizjologia roślin*. PWN, Warszawa.
- Krivoszeeva A.A., Venediktov P.S., Alekseev A.A. 1992. Vysokotemperaturnaja fluorescencija chlorofilla v tkaniach rastenij i vydelenych iz nich chloroplastach. *Fizjol. Rastenij*, 39 (1): 73-77.
- Kyle O.I., Ohad J., Arntzen C.I. 1984. Membrane protein damage and repair. Selective loss of a quinone-protein function in chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 4070-4074.
- Lavorel J., Breton J., Lutz M. 1986. Methodological principles of measurements of light emitted by photosynthetic systems. In: *Light emission by plants and bacteria*. Academic Press, Inc.: 57-98.
- Lemoine Y., Dubacq J.P., Zabalón G. 1986. Organisation 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., Rinderle U., Schmuck G. 1986. Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology. *Radiat. Environm. Biophys.*, 25: 297-308.
- Murkowski A. 1987. Photosynthetic luminescence assay for determination of triazine resistance of rape plants. *Proc. 7th Int. Rapeseed Congress, Poznań, 11-14.05.1987, vol. 4: 830-836*.
- Murkowski A. 1988. Comparison of the delayed luminescence in triazine susceptible and resistant biotypes of *Brassica napus*. *Cruciferae Newsletter*, 13: 119.
- Murkowski A. 1993. Wykorzystanie wysokotemperaturowej fluorescencji w badaniach aparatu fotosyntetycznego. *Mater. V Ogólnopol. Sesji Nauk. Oddz. Techn. Roln. AR w Szczecinie*, 250.
- Murkowski A. 1995. Biofizyczne metody badania fotosyntezy roślin rzepaku odpornych na herbicydy triazynowe. *Rośliny Oleiste*, XVI (1): 127-132.
- Murkowski A. 1996a. Zastosowanie testu luminescencyjnego do określenia triazynoodporności w różnych genotypach rzepaku. *Rośliny Oleiste*, XVII (1): 281-285.
- Murkowski A. 1996b. Luminescence assay for determination of triazine resistance of rape plants. *Proc. 2nd Int. Weed Control Congress*, 2: 541-545.
- Schreiber U., Berry J.A. 1977. Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in intact leaves correlated with damage of the photosynthetic apparatus. *Planta*, 136: 233-238.
- Seeman J.R., Berry J.A., Downton W.J.S. 1984. Photosynthetic response and adaptation to high temperature in desert plants. A comparison of gas exchange and fluorescence methods for studies of thermal tolerance. *Plant Physiology*, 75: 364.
- Stanek R. 1994. Effect of solar irradiation on the features of photosynthetic apparatus and on the growth of triazine susceptible and resistant biotypes of *Erigeron canadensis* L. *Zesz. Probl. Post Nauk Rol.*, 405: 163-167.
- Starck Z., Chołuj D., Niemyska B. 1995. *Fizjologiczne reakcje roślin na niekorzystne czynniki środowiska*. Wyd. SGGW Warszawa.