

Antoni Murkowski

Akademia Rolnicza w Szczecinie, Zakład Fizyki

## Wpływ chłodu i natężenia światła na aktywność fotosystemu II w liściach rzepaku jarego

### Effect of chill and intensity of light on the activity photosystem II in spring oilseed rape

Słowa kluczowe: chłód, fluorescencja chlorofilu, fotoinhibicja, regeneracja

Key words: chill, chlorophyll fluorescence, photoinhibition, recovery

W pracy przedstawiono wyniki badań wpływu chłodu i zwiększonego napromieniowania ( $4^{\circ}\text{C}$ ; PPFD  $900 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) na fluorescencję chlorofilu w liściach młodych roślin rzepaku jarego. Pomiar fluorescencji wykonywano przy użyciu fluorymetru PAM i wyznaczano parametry:  $F_v/F_m$ , Y i Rfd. Pomiar wykonywano: w warunkach wzrostu ( $18^{\circ}\text{C}$ ; PPFD  $180 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), po 2 h ekspozycji roślin na niską temperaturę ( $4^{\circ}\text{C}$ ) i silne napromieniowanie (PPFD  $900 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) oraz po 24 h regeneracji ( $18^{\circ}\text{C}$  w ciemności). Pomiar wykonano na dwutygodniowym liściu I, a po 20 dniach – na liściu II. Podwyższony poziom PAR przy obniżonej temperaturze spowodował znaczne obniżenie wartości wszystkich parametrów, a szczególnie Rfd (wskaźnika vitalności). Po 24 godzinach restytucji wartości parametrów osiągnęły od około 85 do 94% wartości kontrolnych. Badania wykazały, że w efekcie jednoczesnego oddziaływania silnego światła i niskiej temperatury na badane liście rzepaku jarego (rośliny uznawanej za tolerancyjną na chłód) nastąpiło dość poważne i długotrwałe zakłócenie reakcji fotosyntetycznych w PS II.

The paper presents the results of research of the effect of chill ( $4^{\circ}\text{C}$  under high light (PPFD  $900 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) on chlorophyll fluorescence in leaves of young spring oilseed rape plants. Fluorescence measurements were done with a PAM fluorimeter Walz, and the following parameters were estimated:  $F_v/F_m$ , Y and Rfd (vitality index). The measurements were carried out under control conditions ( $18^{\circ}\text{C}$ , PPFD  $180 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), after 2-hour plant exposure to low temperature ( $4^{\circ}\text{C}$ ) and a high radiation (PPFD  $900 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), and after 24-hour regeneration ( $18^{\circ}\text{C}$ , darkness). The measurements were carried out on the 1st leaf after 14 days, and on the 2nd leaf after 20 days. The strong illumination in low temperature resulted in considerable decrease in all the parameters, particularly Rfd. After 24-hour regeneration, all the parameters regained 85 to 94% of their control values. The studies demonstrated that the simultaneous activity of high light and low temperature on leaves of spring oilseed rape (a plant considered chill-tolerant) resulted in severe and long-term disturbance of PS II photosynthesis reactions.

## Wstęp

---

Niekorzystne zmiany klimatu mogą stanowić jedną z przyczyn obniżenia plonów rzepaku w uprawach ozimych i jarych. Rzepak jary jest szczególnie wrażliwy na niedobór wody w początkowych fazach wzrostu. Podobnie jak w przypadku innych upraw jarych, warunkiem dobrych i terminowych zbiorów rzepaku jest wczesny jego wysiew oraz szybki start wzrostu wegetatywnego. W takich warunkach przy właściwej agrotechnice oraz intensywnej fotosyntezie rośliny mogą szybko rozwinąć system korzeniowy i wykorzystać pozimowe zapasy wody w glebie. Rzepak jary wysiany na przełomie marca i kwietnia jest nierzadko narażony na nocne przymrozki i kilkugodzinne okresy chłodu przy względnie dużym natężeniu promieniowania fotosyntetycznego (PAR). Rzepak jary toleruje umiarkowanie niską temperaturę i jej spadek do  $-4^{\circ}\text{C}$  podczas wschodów, a w fazie rozwiniętych liści nawet przymrozki do  $-7^{\circ}\text{C}$  nie wywołują trwałych uszkodzeń (Wałkowski 2000). Gdy jednak obniżonej temperaturze towarzyszyć będzie zwiększone natężenie PAR (np. słoneczny chłodny ranek), może mieć miejsce efekt niskotemperaturowej fotoinhibicji. Następuje to wtedy, gdy zielone tkanki roślin pochłoną więcej energii PAR niż są w stanie przetworzyć na energię chemiczną w procesie fotosyntezy. Fotoinhibicję może wywołać nagły wzrost napromieniowania, kilkakrotnie przewyższający dotychczasowy jego poziom lub nawet umiarkowane natężenie PAR, przy jednoczesnym oddziaływaniu czynników stresowych ograniczających szybkość asymilacji  $\text{CO}_2$  w fazie ciemnej fotosyntezy (Baker i in. 1988; Starck 1995; Hall i Rao 1999). W naszych warunkach klimatycznych często takim czynnikiem jest niska dodatnia temperatura (chłód).

W efekcie niskotemperaturowej fotoinhibicji w chloroplastach roślin chłodowrażliwych (pomidor, ogórek, kukurydza) następuje spowolnienie fotosyntetycznego transportu elektronów w PS II, ograniczenie fotofosforylacji i generowane są aktywne formy tlenu (Smillie i in. 1988; Peeler i Naylor 1988; Kratsch i Wise 2000). Szczególnie niebezpieczna jest blokada transportu elektronów sprzyjająca przekształcaniu uwalnianego  $\text{O}_2$  w wysoko aktywną formę tlenu singletowego ( $^1\text{O}_2$ ) mającego zdolność utleniania chlorofilu w centrum reakcji PS II, a w dalszej kolejności także i innych barwników w antenach energetycznych (LHC, LHC II), doprowadzając do destrukcji tych anten (Hendrich 1995; Hall i Rao 1999). Innym groźnym efektem wywołanym przez aktywne formy tlenu w PS II jest denaturacja D1 – kluczowego białka w tym makrokompleksie (Sączyńska 1993; Krause 1994; Hendrich 1995).

Można przypuszczać, że niskotemperaturowa fotoinhibicja staje się poważnym zagrożeniem dla wzrostu i plonowania wszystkich roślin, gdy w warunkach chłodu i silnego napromieniowania PAR przestają wystarczać mechanizmy rozpraszania nadmiaru energii wzbudzenia (np. poprzez cykl ksantofilowy, cykliczny i pseudocykliczny transport elektronów), a systemy przeciwutleniające nie są

w stanie uchronić komórek roślinnych przed szkodliwym działaniem aktywnych form tlenu (Foyer i in. 1994; Gruszecki 1995; Huner i in. 1996). Mechanizmy i skutki stresu chłodowego, a zwłaszcza wpływu niskotemperaturowej fotoinhibicji na funkcje aparatu fotosyntetycznego można badać przy pomocy metod luminescencyjnych np.: indukcji fluorescencji chlorofilu, opóźnionej luminescencji chlorofilu, ultrasłabej biochemiluminescencji (Lichtenthaler i Rinderle 1988; Skórska i Murkowski 1988; Krause i in. 1990; Viesielovskij i Viesielova 1990; Schapendonk i in. 1992; Bolhár-Nordenkamp i Öquist 1993; Murkowski i Skórska 1997).

## Material i metody

---

Rośliny rzepaku jarego rosły w termoluminostacie na podłożu piaskowym, podlewane pożywką Hoaglanda (50%), przy oświetleniu lampami rtęciowymi LRFR 400 (PPFD  $180 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperiod 12 h), w temperaturze  $18^{\circ}\text{C}/15^{\circ}\text{C}$ , odpowiednio: dzień/noc. Do badań pobierano krążki o średnicy 9 mm wycięte z pierwszego liścia — I (po 14 dniach) i liścia drugiego — II (po 20 dniach wzrostu roślin). W każdej serii było 8 krążków pobranych z liści należących do 8 roślin. Krążki umieszczano na powierzchni wody w szalkach, a następnie inkubowano w termoluminostacie ( $18^{\circ}$ , PPFD  $180 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Po 2 godzinach inkubacji wykonywano pierwszą serię pomiarów (kontrolnych). Pomiary fluorescencji chlorofilu (FL) wykonywano przy użyciu fluorymetru PAM 200 (prod. Walz, Niemcy) wyznaczając parametry:

- $F_v/F_M$  maksymalna efektywność reakcji fotochemicznej w PS II wyznaczona po adaptacji ciemniowej i po całkowitej redukcji akceptorów w PS II (Bolhár-Nordenkamp i Öquist 1993),
- Y maksymalna wydajność konwersji energii fotonów PAR na energię chemiczną w danych warunkach świetlnych (Schreiber 1997),
- Rfd wskaźnik witalności informujący o współdziałaniu reakcji fazy świetlnej z reakcjami fazy ciemnej i określający potencjalną aktywność fotosyntetyczną (Lichtenthaler i Rinderle 1988),
- $F_v$  fluorescencja zmienna (w warunkach ciemniowych),
- $F_M$  fluorescencja maksymalna (w warunkach ciemniowych).

Po wyznaczeniu parametrów kontrolnych szalki z krążkami przenoszono do innego termoluminostatu ( $4^{\circ}\text{C}$ , PPFD  $900 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), gdzie warunki sprzyjały niskotemperaturowej fotoinhibicji. Po 2 godzinach wykonywano drugą serię pomiarów wyznaczając te same parametry FL. Po pomiarach odstawiano szalki z badanymi krążkami do zaciemnionej kamery (temp. ok.  $18^{\circ}\text{C}$ ) w celu regeneracji powstałych uszkodzeń. Po 24 godz. wykonywano trzecią serię pomiarów. Taką samą procedurę stosowano przy pomiarach FL chlorofilu w liściach I oraz II.

Wyniki pomiarów kontrolnych (średnie arytmetyczne) przedstawiono w tabeli 1. W tabelach 2 i 3 przedstawiono względne wartości (kontrola 100%) uśrednionych wartości parametrów dla krążków z liści I i II w kolejnych seriach pomiarowych. Porównano wyniki pomiarów parametrów FL dla liści I i II przy pomocy testu t-Studenta, oznaczając gwiazdkami średnie różniące się istotnie na określonym poziomie istotności.

## Wyniki i dyskusja

W warunkach kontrolnych wyznaczone parametry fluorescencji chlorofilu dla liści II były wyższe niż dla I, z wyjątkiem  $F_V/F_M$ , dla którego różnica nie była istotna (tab. 1).

Tabela 1  
Wartości parametrów fluorescencji chlorofilu w liściach rzepaku wyznaczone w warunkach kontrolnych — *Chlorophyll fluorescence parameters in the leaves of oilseed rape grown under control conditions*

	$F_V/F_M$	Y	Rfd
I liść — <i>1st leaf</i>	0,715 ± 0,036	0,583 ± 0,013	1,82 ± 0,10
II liść — <i>2nd leaf</i>	0,735 ± 0,017	0,606 ± 0,008	1,98 ± 0,12
	b.r.	**	**

Różnice istotne na poziomie istotności 0,01 oznaczono \*\*, b.r. – brak różnicy istotnej na poziomie 0,05  
*Difference significant at the significance level 0.01 marked as \*\*, b.r. – difference not significant at 0.05 level*

Po 2 godzinach jednoczesnego oddziaływania silnego światła (pięciokrotnie przewyższającego poziom PAR podczas wzrostu) i niskiej temperatury (4°C) wartości wyznaczanych parametrów uległy znacznemu obniżeniu, co świadczy o niskotemperaturowej fotoinhibicji procesu fotosyntezy (Krause 1994; Murkowski i Skórska 1997; Hall i Rao 1999). Pod wpływem wywołanego stresu znacznie zmniejszyły się średnie wartości wskaźnika witalności Rfd, natomiast w stopniu stosunkowo mniejszym nastąpiło obniżenie wartości parametrów  $F_V/F_M$  i Y, które charakteryzują wydajność reakcji fotochemicznych w PS II (tab. 2).

Można stąd wnioskować, że czynniki stresowe w poważnym stopniu zmniejszyły efektywność reakcji fazy ciemnej fotosyntezy (Lichtenthaler i Rinderle 1988; Croxdale i Omasa 1990). W warunkach świetlnych aktywność reakcji fotosyntezy określa parametr Y (Schreiber 1997). W liściach I wartość tego parametru uległa obniżeniu o ponad 77% natomiast w liściach II utrzymała się na poziomie ok. 43% wartości kontrolnych (tab. 2). Krążki liściowe poddano następnie regeneracji, aby ocenić zdolność aparatu fotosyntetycznego badanych roślin do przezwyciężenia negatywnych efektów niskotemperaturowej fotoinhibicji (Smillie 1988). W tabeli 3

przedstawiono względne wartości (kontrola 100%) wyznaczonych parametrów dla krążków z liści I i II. Po 24 godzinach regeneracji wartości wszystkich parametrów zdecydowanie wzrosły, a początkowe różnice pomiędzy liśćmi I i II praktycznie zanikły.

Tabela 2

Względne wartości parametrów fluorescencji chlorofilu w liściach rzepaku wyznaczone po działaniu chłodu i światła — *Relative values of the chlorophyll fluorescence parameters in the leaves of oilseed rape determined after chill and high light stress*

	F <sub>V</sub> /F <sub>M</sub> [%]	Y [%]	Rfd [%]
I liść — <i>1st leaf</i>	43,1± 4,4	32,5± 4,4	25,8± 3,2
II liść — <i>2nd leaf</i>	45,4± 2,5	42,8± 2,1	26,7± 2,9
	b.r.	***	b.r.

Różnice istotne na poziomie istotności 0,001 oznaczono \*\*\*, b.r. – brak różnicy na poziomie istotności 0,05 — *Difference significant at the significance level 0.001 marked as \*\*\*, b.r. – difference not significant at 0.05 level*

Tabela 3

Względne wartości parametrów fluorescencji chlorofilu w liściach rzepaku wyznaczone po 24 godzinach regeneracji — *Relative values of the chlorophyll fluorescence parameters in the leaves of oilseed rape determined after 24 h recovery*

	F <sub>V</sub> /F <sub>M</sub> [%]	Y [%]	Rfd [%]
I liść — <i>1st leaf</i>	91,0 ± 2,7	85,5 ± 4,2	86,3 ± 8,3
II liść — <i>2nd leaf</i>	94,0 ± 3,9	84,5 ± 3,6	85,1 ± 8,8
	b.r.	b.r.	b.r.

b.r. — brak różnicy przy poziomie istotności 0,05 — *difference not significant at the level of 0.05*

Warto zauważyć, że po okresie regeneracji, zarówno wydajność przemiany energii PAR na energię chemiczną (Y), jak i wskaźnik witalności (Rfd) pozostawały wciąż jeszcze o ok. 15% niższe od wartości kontrolnych. Ten utrwalony efekt niskotemperaturowej inhibicji może być jedną z przyczyn spowolnionego wzrostu i niestabilnego plonowania rzepaku jarego w niesprzyjających warunkach klimatycznych.

## Podsumowanie

1. Chłód i duże natężenie promieniowania PAR spowodowały znaczne (choć nierównomierne) obniżenie wartości wszystkich wyznaczonych parametrów fluorescencji chlorofilu, co świadczy o silnej inhibicji reakcji fazy świetlnej fotosyntezy w liściach rzepaku jarego.

2. Wyniki pomiarów wykonanych na pierwszych i drugich liściach rzepaku nie wykazywały istotnych różnic, z wyjątkiem wydajności reakcji fotochemicznej PS II w warunkach świetlnych, która w warunkach niskotemperaturowej fotoinhibicji pozostawała znacząco wyższa w chloroplastach liści drugich.
3. Po 24 h regeneracji, wartości wyznaczanych parametrów znacznie wzrosły, zarówno w liściach pierwszych, jak i drugich, chociaż nie osiągnęły wartości otrzymanych dla kontroli.

## Conclusions

---

1. Chill and high PAR intensity resulted in considerable (though uneven) decrease in the values of all the parameters, which demonstrates a strong inhibition of light-phase photosynthesis.
2. The values recorded for younger leaves did not differ significantly from those obtained for older leaves, except for the light-phase photochemical reaction efficiency in the PS II, which remained significantly higher in the older plants under low temperature — photoinhibition stress.
3. After the recovery, the values of the parameters considerably increased in both younger and older plants, however without regaining the control levels.

## Literatura

---

- Baker N.R., Long S.P., Ort D.R. 1988. Photosynthesis and temperature, with particular reference to effects on quantum yield. In: Plant and temperature. Great Britain Soc. for Exp. Biol.: 347-375.
- Bolhár-Nordenkamp H.R., Öquist G. 1993. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: Photosynthesis and production in a changing environment. A field and laboratory manual. (Eds. Hall D. O. et al.) Chapman & Hall, London, 12: 193-206.
- Croxdale J.G., Omasa K. 1990. Chlorophyll *a* fluorescence and carbon assimilation in developing leaves of light-grown cucumber. *Plant Physiol.* 93, 1078-1082.
- Foyer C.H., Lelandais M., Kunert K.J. 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* 92: 696-717.
- Hall D.O., Rao K.K. 1999. Fotoinhibicja. W: Fotosynteza. WNT, Warszawa: 216-221.
- Kratsch H., Wise R.R. 2000. The ultrastructure of chilling stress. *Plant, Cell Environ.* 23: 337-350.
- Hendrich W. 1995. Response of the photosynthetic apparatus to the excess light intensity. *Acta Physiol. Plant.* 17 (2): 153-165.
- 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 consumption: redox state of photosystem II. *Physiol. Plant.* 98: 358-364.
- Gruszecki W.I., 1995. Different aspects of protective activity of the xanthophyll cycle under stress conditions. *Acta Physiol. Plant.* 17 (2): 145-152.

- Krause G.H., Somersalo S., Zumbusch E., Weyers B., Laasch H. 1990. On the mechanism of photoinhibition in chloroplasts relationship between changes in fluorescence and activity of photosystem II. *J. Plant Physiol.* 136: 472-479.
- Krause G.H. 1994. Photoinhibition induced by low temperatures. W: Photoinhibition of photosynthesis, from molecular mechanisms to the field (Eds. Baker N.R. and Bowyer). BIOS Scientific Publishers Limited Oxford: 331-348.
- 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): 29-85.
- Murkowski A., Skórska E. 1997. Chlorophyll *a* luminescence an index of photoinhibition damages. *Curr. Top. Biophys.* 21 (1): 72-78.
- Peeler T.C., Naylor A.W. 1988. A comparison of the effects of chilling on thylakoid electron transfer in pea (*Pisum sativum* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Physiol.* 86: 147-151.
- Sączyńska V. 1993. Molekularny mechanizm fotoinhibicji. *Post. Biol. Komórki* 20 (1): 45-65.
- Schreiber U. 1997. Chlorophyll fluorescence and photosynthetic energy conversion. Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany, s. 43-45.
- Skórska E., Murkowski A. 1988. Photosynthetic luminescence detection as the quick test of chilling resistance of cucumber plants. *Hod. Roślin, Aklimat. i Nasien.* 32 (1/2): 285-289.
- Starck Z. 1995. Stresy klimatyczne. W: Fizjologiczne reakcje roślin na niekorzystne czynniki środowiska (red. Z. Starck, D. Chołuj, B. Niemyska). Wyd. SGGW Warszawa, 7-94.
- 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.
- Smillie R.M., Hetherington S.E., Jie He, Nott R. 1988. Photoinhibition at chilling temperatures. *Aust. J. Plant Physiol.*, 15: 207-222.
- Veselovsky V.A., Veselova T.V. 1990. Luminescencija rastenij. Nauka. Moskwa.
- Wałkowski T. 2000. Rzepak jary. IHAR, Poznań.