

OCENA REAKCJI MIKROROZMNAŻANYCH ROŚLIN NA STRESY BIOTYCZNE I ABIOTYCZNE Z ZASTOSOWANIEM METODY FLUORESCENCJI CHLOROFILU¹

Barbara Michalczuk, Bożena Borkowska

Zakład Fizjologii i Biochemii, Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach

Wstęp

Rośliny rozmnażane metodą *in vitro* poddane są działaniu licznych stresów, zarówno podczas prowadzenia kultur jak i w czasie aklimatyzacji. W warunkach stresowych funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego ulega zaburzeniom co w rezultacie obniża kondycję roślin [BISWAL i in. 1989]. Wysoka wrażliwość aparatu fotosyntetycznego na warunki stresowe została wykorzystana do oceny zdolności adaptacyjnych roślin do zmieniających się warunków, za pomocą metody pomiaru fluorescencji chlorofilu [LICHTENTHALER i in. 1986].

Rośliny pochodzące z kultur *in vitro* pozbawione są wszelkiej mikroflory. Jest to sytuacja nie spotykana w świecie roślin, utrudniająca „łagodne” przechodzenie z warunków *in vitro* do warunków naturalnych. Od kilku lat prowadzone są badania nad zasiedlaniem roślin pochodzących z kultur sterylnych, grzybami mikoryzowymi, w celu ułatwienia im rozpoczęcia aktywnej fotosyntezy i wyrównania bilansu wodnego [MONTICELLI i in. 2000].

Ważnym etapem mikrorozmnazania jest dobranie podłoża, które zminimalizowałoby stresi związane z gwałtowną zmianą zarówno stosunków wodnych, żywienia mineralnego i sprzyjało właściwemu rozwojowi mikoryzy [VOSATKA, GRYNDLER 2000].

Celem prowadzonych badań było sprawdzenie czy metoda pomiaru fluorescencji chlorofilu może być przydatna do oceny aktywności fotosyntetycznej: 1) podkładek jabłoni M9 rozmnażanych *in vitro*, zasiedlonych przez mikoryzę AMF (arbuscular mycorrhizal fungi) i bez mikoryzy; 2) petunii ukorzenianej i rosnącej w podłożu o różnym pH i różnych właściwościach fizycznych.

Materiał i metody

Kultury sterylne podkładek jabłoni M9 i petunii były zakładane, namnażane i ukorzeniane wg standardowej metody stosowanej w Zakładzie Fizjologii i Bio-

¹ Doświadczenia były prowadzone w ramach programu międzynarodowego COST Akcja 843 i były częściowo finansowane przez KBN.

chemii Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa. Inokulacja ukorzonej *in vitro* podkładki M9 grzybami mikoryzowymi (firma BIORIZE, Francja) wykonana była podczas przenoszenia roślinek „ze szkła” do doniczek.

Rośliny petunii ukorzeniane były *ex vitro*, w podłożu o różnym składzie (mieszanka torfu, perlitu, wełny mineralnej – Grodanu lub w samej wełnie mineralnej) oraz różnej kwasowości. Przez cały okres doświadczenia rosły w tym samym podłożu.

Pomiary fluorescencji chlorofilu wykonywane były aparatem PEA (Hansatech, England). Ze wszystkich mierzonych i obliczanych parametrów, do oceny aktywności fotosyntetycznej wykorzystane były tylko niektóre: Fm (fluorescencja maksymalna), Tfm (czas narastania sygnału fluorescencyjnego od fluorescencji podstawowej – Fo do maksymalnej – Fm), Fv/Fm (wskaźnik wydajności fotochemicznej) – charakteryzujące aktywność fotochemiczną świetlnej fazy fotosyntezy oraz Fs (wartość stała po całkowitym wygaszeniu) i Rfd (współczynnik witalności) charakteryzujące relacje między świetlną i ciemniową fazą fotosyntezy. Pomiary wykonywane były w okresie intensywnego wzrostu roślin znajdujących się w szklarni (6 tygodni po posadzeniu). Przed pomiarem rośliny były przenoszone do stałych warunków świetlnych i temperaturowych. Na podkładce jabłoni M9 fluorescencja chlorofilu była mierzona na dwóch liściach: bardzo młodym, jeszcze nie wykształconym oraz na w pełni uformowanym, którym był 4–5 liść pod wierzchołkiem. Pomiary petunii wykonywane były na w pełni rozwiniętym liściu, którym był 5–6 liść pod wierzchołkiem.

Doświadczenia były prowadzone w układzie jednoczynnikowym. W każdej kombinacji znajdowało się 10 roślin, jedna roślina stanowiła powtórzenie. Wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. Do oceny istotności różnic zastosowano test Duncana lub Tukeya, przy poziomie wiarygodności 0,05.

Wyniki i dyskusja

Mikoryza

Parametry fluorescencji określające aktywność fotochemiczną liści młodych są tylko nieco lepsze dla roślin zasiedlonych przez AMF w porównaniu do roślin bez mikoryzy. Istotnie niższa wartość Fs i wyższa Rfd dla młodych liści z roślin AMF, wskazuje na lepsze funkcjonowanie strony ciemniowej fotosyntezy tej grupy roślin (tab. 1). Wysoka wartość Fs jest wynikiem ograniczonego zużycia ATP w cyklu Calvina [KRAUSE, WEISS 1984]. Niższa aktywność enzymatyczna strony ciemniowej fotosyntezy działa zwrotnie na ograniczenie aktywności procesów fotochemicznych. Współczynnik witalności obliczany jest wg wzoru $Rfd = (Fm - Fs) : Fs$, a więc wyższa jego wartość jest związana z niższą Fs i wskazuje na dobre funkcjonowanie strony ciemniowej fotosyntezy. W warunkach zapewniających wysoką aktywność fotosyntetyczną wartość Rfd wynosi 3–4 [LICHTENTHALER i in. 1986]. W liściach w pełni rozwiniętych podkładki jabłoni M9, wszystkie parametry wskazują na wyższą aktywność fotosyntezy w porównaniu do liści bardzo młodych. Wysoka wartość maksymalnej fluorescencji (Fm) osiągniętej w krótszym czasie (Tfm) oraz wyższa wartość parametru Fv/Fm świadczy o lepszym funkcjonowaniu fotosystemów roślin zasiedlonych AMF. Krótszy czas (Tfm) potrzebny do osiągnięcia wyższego Fm (przy stałym Fo) może wskazywać na większe anteny oraz/lub sprawniejszy transport elektronów w obecności mikoryzy.

Tabela 1; Table 1

Wybrane parametry fluorescencji chlorofilu liści podkładki jabłoni M9,
w zależności od mikorzyzy

Selected chlorophyll fluorescence parameters of rootstock M9 leaves,
depending on mycorrhiza

Liść Leaf	AMF	Parametry fluorescencji chlorofilu; Chlorophyll fluorescence parameters				
		Fv/Fm	Fm	Tfm	Fs	Rfd
Młody; Young	-	0,752 a	2295 a	616 a	1748 b	0,32 a
	+	0,790 a	2257 a	546 a	1554 a	0,46 b
Rozwinięty Developed	-	0,818 a	2477 a	458 b	948 b	1,66 b
	+	0,830 b	2651 b	391 a	818 a	1,26 a

Fv/Fm – wskaźnik wydajności fotochemicznej; maximal photochemical quantum yield

Fm – fluorescencja maksymalna; maximal fluorescence

Tfm – czas narastania sygnału fluorescencyjnego od Fo do Fm; rise time from Fo to Fm

Fs – wartość końca fazy świetlnej; steady state fluorescence

Rfd – wskaźnik vitalności; vitality index

Istotność różnic oceniana testem Duncana; Significance of differences according to Dunacan's test

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie; Values indicated with the same letter are not significantly different

W bardzo młodych liściach istotne różnice pomiędzy roślinami AMF i bez mikorzyzy występują tylko dla wskaźników Fs i Rfd (tab. 1). Mogłoby to wskazywać, że mikoryza wpływa najpierw na funkcjonowanie ciemniowej fazy fotosyntezy, a dopiero wtórnym efektem jest regulacja aktywności strony fotochemicznej. Oprócz bezpośredniego wpływu, mikoryza może regulować fotosyntezę pośrednio stymulując wzrost przede wszystkim systemu korzeniowego ale także części nadziemnej roślin [AUGE 2001].

Podłoża

Standardowym podłożem stosowanym w uprawie petunii jest mieszanka torfu z perlitem (1 : 1) o pH 4,7. Wszystkie parametry fluorescencji wskazują jednak na wyższą aktywność fotosyntezy roślin rosnących w podłożu torf – wełna mineralna (Grodan), (tab. 2). Przypuszczamy, że może to być związane z lepszym rozwojem systemu korzeniowego (korzystniejsza kwasowość i lepsze stosunki wodno-powietrzne), który jest odbiorcą asymilatów i pośrednio może wpływać na aktywność fotosyntezy [HALL, WILLIAMS 2000].

Tabela 2; Table 2

Wybrane parametry fluorescencji chlorofilu liści petunii rosnącej
w różnym substracie przez 6 tygodni

Selected chlorophyll fluorescence parameters of petunia plants
growing in different substrates for 6 weeks

Podłoże Substrate	pH	Parametry fluorescencji chlorofilu Chlorophyll fluorescence parameters			
		Fv/Fm	Fm	Tfm	Rfd
Grodan; Rockwool	7,64	0,811 a	2364 a	337 b	1,90 a
Torf-Grodan; Peat-rockwool	5,77	0,844 b	2561 b	293 a	2,23 b
Torf-perlit; Peat-perlite	4,06	0,817 a	2253 a	263 a	2,12 ab

Istotność różnic oceniana testem Tukey; Significance of differences according to Tukey test
Objaśnienia jak w tabeli 1; Explanations see Table 1

Wnioski

1. Zasiedlenie mikrorozmnażanych roślin grzybami mikoryzowymi może podnieść aktywność fotosyntetyczną roślin, wpływając najpierw na ciemniową stronę fotosyntezy i w wyniku sprzężenia zwrotnego poprawiając sprawność fotosystemów.
2. Pomiar fluorescencji chlorofilu można wykorzystać do oceny reakcji roślin pochodzących z kultur *in vitro* na zastosowane podłoże.

Podziękowanie

Autorzy dziękują p. Krystynie Galer za pomoc w prowadzeniu doświadczeń oraz dr Bacharowi Blal (firma BIORIZE, Francja) za udostępnienie inokulum mikoryzy.

Literatura

- AUGE R.M. 2001. *Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis*. Mycorrhiza 11: 3–42.
- BISWAL B., RAVAL M.K., BISWAL U.C. 1989. *Changes in chlorophyll fluorescence during aging of cell free chloroplasts*. Biochem. Physiol. Pflanzen 184: 213–218.
- HALL H., WILLIAMS L.E. 2000. *Assimilate transport and partitioning in fungal biotrophic interactions*. Austr. J. Plant Physiol. 27(6): 549–560.
- KRAUSE G.H., WEISS E. 1984. *Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of fluorescence signals*. Photosynth. Res. 5: 139–157.
- LICHTENTHALER H.K., BUSCHMANN C., RINDERLE U., SCHMUCK G. 1986. *Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology*. Radiat. Environ. Biophys. 25: 297–308.
- MONTICELLI S., PUPPI G., DAMIANO C. 2000. *Effects of in vivo mycorrhization on micropropagated fruit tree rootstocks*. Applied Soil Ecology 15(2): 105–111.
- VOSATKA M., GRYNGLER M. 2000. *Response of micropropagated potatoes transplanted to peat media to post-vitro inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria*. Applied Soil Ecology 15(2): 145–152.

Słowa kluczowe: fluorescencja chlorofilu, mikoryza, mikrorozmnażanie, petunia, podkładka jabłoni, podłoże

Streszczenie

Rośliny rozmnażane technikami *in vitro* podlegają licznym stresom co wpływa negatywnie na ich funkcjonowanie i obniża ich jakość. Bardzo ważnym staje się więc szybka i prosta metoda oceny roślin pochodzących z kultur *in vitro*, na stresy zarówno biotyczne jak i abiotyczne. Taką możliwość stwarza pomiar fluorescencji chlorofilu.

Celem prowadzonych badań było sprawdzenie czy metodą pomiaru fluorescencji chlorofilu można określić: 1) różnice w aktywności fotosyntetycznej mikro-

rozmnażanych podkładek jabłoni zasiedlonych grzybami mikoryzowymi (AMF) i bez mikoryzy; 2) aktywność fotosyntetyczną roślin petunii ukorzenianych i rosnących w substracie o różnym pH i różnych właściwościach fizycznych.

Zasiedlenie podkładek jabłoni M9 przez AMF powodowało obniżenie wartości końca fazy świetlnej (Fs) i podniesienie wskaźnika witalności (Rfd), co świadczy o intensyfikacji procesów zachodzących w fazie ciemniowej fotosyntezy. W liściach starszych obecność mikoryzy wpływała na lepsze funkcjonowanie fotosystemów, co zostało wykazane wyższą wartością fluorescencji maksymalnej (Fm) osiągniętą w krótszym czasie narastania sygnału fluorescencyjnego (Tfm) i wyższą wartością stosunku wskaźnika wydajności fotochemicznej (Fv/Fm). Otrzymane wyniki wskazują, że mikoryza poprawiała sprawność reakcji zachodzących w cyklu Calvina i dopiero jako efekt sprzężenia zwrotnego podnosiło się funkcjonowanie strony świetlnej fotosyntezy.

Skład substratu i jego kwasowość miały wpływ na wartość parametrów fluorescencji chlorofilu liści petunii. Wskazują one, że najwyższą aktywność fotosyntetyczną (w obu fazach – ciemniowej i świetlnej) miały rośliny rosnące w podłożu torf – wełna mineralna (1 : 1). Wydajność fotosyntetyczna roślin uprawianych na standardowym podłożu stosowanym w ogrodnictwie (torf – perlit) była istotnie niższa.

Otrzymane wyniki wskazują, że metoda pomiaru fluorescencji chlorofilu może być stosowana z pełnym sukcesem do oceny fizjologicznej roślin pochodzących z kultur *in vitro*.

CHLOROPHYLL FLUORESCENCE AS AN INDEX OF THE ABILITY OF MICROPROPAGATED PLANTS TO WITHSTAND BIOTIC AND ABIOTIC STRESSES

Barbara Michalczuk, Bożena Borkowska

Research Institute of Pomology and Floriculture, Skierniewice

Key words: apple rootstock, chlorophyll fluorescence, micropropagation, mycorrhiza, petunia, substrate

Summary

It is well known that plants produced by *in vitro* techniques can show morphological and physiological changes that reduce their quality. Thus, it is important to determine the state of *in vitro* derived plants as quickly as possible. Such possibility can be provided by measurement of chlorophyll fluorescence induction.

The aim of this study was to test whether measurement of chlorophyll fluorescence would allow for fast estimation of: 1) differences in photosynthetic status of the micropropagated plantlets colonised by mycorrhizal fungi (AMF) and growing without symbiont; 2) photosynthetic activity of petunia plantlets growing on the substrates with different pH and physical properties.

Colonisation of apple rootstock M9 by AMF: The lower values of Fs and higher Rfd show a better functioning of a dark phase of photosynthesis of young leaves from AMF-plants. In fully developed leaves photochemical reactions of

photosynthesis were stimulated, which is shown by an increase of Fv/Fm value. This was highly correlated with significantly higher value of Fm and lower value of Tfm.

Substrate composition and its acidity: the chlorophyll fluorescence indices show that photosynthetic activity of petunia plants rooted and growing in peat-rockwool (1 : 1) substrate, was the highest.

Our results show that chlorophyll fluorescence could be successfully used to evaluate physiological status of micropropagated plants.

Prof. dr hab. Bożena **Borkowska**
Zakład Fizjologii i Biochemii
Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa
ul. Pomologiczna 18
96-100 SKIERNIEWICE
e-mail: bborkow@insad.pl

Akademia Rolnicza w Poznaniu
BIBLIOTEKA GŁÓWNA



CCP004399