

MICHAŁ SULKIEWICZ*, IWONA CIERESZKO

*Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny
Instytut Biologii
Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
E-mail: m.sulkiewicz@uwb.edu.pl*

FLUORESCENCJA CHLOROFILU *a* – HISTORIA ODKRYCIA I ZASTOSOWANIE W BADANIACH ROŚLIN

WSTĘP

Rośliny, glony, sinice oraz niektóre organizmy bakteryjne wykorzystują światło o długościach fali od 400 do 700 nm nazywane promieniowaniem fotosyntetycznie czynnym (ang. photosynthetically active radiation, PAR). Energia słoneczna jest siłą napędową fotosyntezy, podstawowego procesu biochemicznego. Proces ten u organizmów eukariotycznych zachodzi głównie w zielonych tkankach liści, w chloroplastach. Wnętrze organellum zajmuje stroma wypełniona tylakoidami tworzonymi przez wewnętrzną błonę chloroplastu. Cechą charakterystyczną błon transformujących energię świetlną jest obecność kompleksów białkowo-barwnikowych absorbujących głównie światło niebieskie i czerwone. Znanych jest wiele odmian chlorofilu i bakteriochlorofilu, z których tylko dwie pełnią kluczową rolę w procesie fotosyntezy. Wszystkie organizmy zdolne do fotosyntezy oksygenicznej zawierają zawsze chlorofil *a*. W chloroplastach roślin wyższych występuje ponadto chlorofil *b*, stanowiący około 30% ilości chlorofilu *a* (STRZAŁKA 2012). Częsteczka chlorofilu zbudowana jest z pierścieni feoporfiryny oraz reszty fitolu dołączonej wiązaniem estrowym do reszty kwasu propionowego. Układ wiązań sprzężonych pierścieni pirolowych odpowiada za zdolność absorpcji promieniowania świetlnego. Uważa się, że centralnie ułożony

atom magnezu w pierścieniu porfirynowym uczestniczy w agregacji cząsteczek chlorofilu. Funkcją łańcucha fitolu jest zakotwiczenie i zapewnienie odpowiedniej orientacji przestrzennej cząsteczki barwnika w błonie tylakoidu, która jest miejscem przebiegu fazy świetlnej fotosyntezy roślin eukariotycznych oraz sinic. Zawiera ona dwa kompleksy białkowo-barwnikowe nazywane fotosystemem I (PSI) oraz fotosystemem II (PSII), a także kompleks cytochromowy *b₆f* (Cyt) i syntazę ATP. Oba fotoukłady różnią się budową, zawartością barwników asymilacyjnych, białek, lipidów oraz właściwościami spektralnymi. Głównym zadaniem fotosystemów jest absorpcja energii świetlnej przez cząsteczki barwników asymilacyjnych. Energia wzbudzenia cząsteczek chlorofilu wchodzącego w skład centrum reakcji fotochemicznej (ang. reaction center, RC) PSII pochodzi z bezpośredniego pochłonięcia fotonów przez RC, bądź częścię, z transferu energii wzbudzenia cząsteczek barwnikowych systemów antenowych PSII (chlorofile, karotenoidy) (GOVINDJEE 2004). Wydajność przekazywania energii wzbudzenia pomiędzy cząsteczkami chlorofilu wynosi około 100%, natomiast między cząsteczkami chlorofilu i karotenoidów jest niższa (patrz KALAJI 2011). Rośliny wykształciły anteny wewnętrzne, tworzące kompleksy z centrum reakcji foto-

Słowa kluczowe: absorpcja światła, czynniki stresowe, fotosystem, pomiary fluorescencji

*Michał Sulkiwicz jest uczestnikiem projektu „Stypendia dla doktorantów województwa podlaskiego”, współfinansowanego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Działanie 8.2 Transfer wiedzy, Poddziałanie 8.2.2 Regionalne Strategie Innowacji, ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, budżetu państwa oraz środków budżetu Województwa Podlaskiego.

układów, oraz zewnętrzne kompleksy antenowe. Anteny zewnętrzne zbierające energię świetlną to LHCI i LHCII (ang. light harvesting complex), otaczające odpowiednio PSII oraz PSI (KOURIL i współaut. 2005). Energia świetlna po zaabsorbowaniu przez cząsteczki chlorofilu *a* kompleksu antenowego jest wielokrotnie transformowana przed zamianą na energię chemiczną.

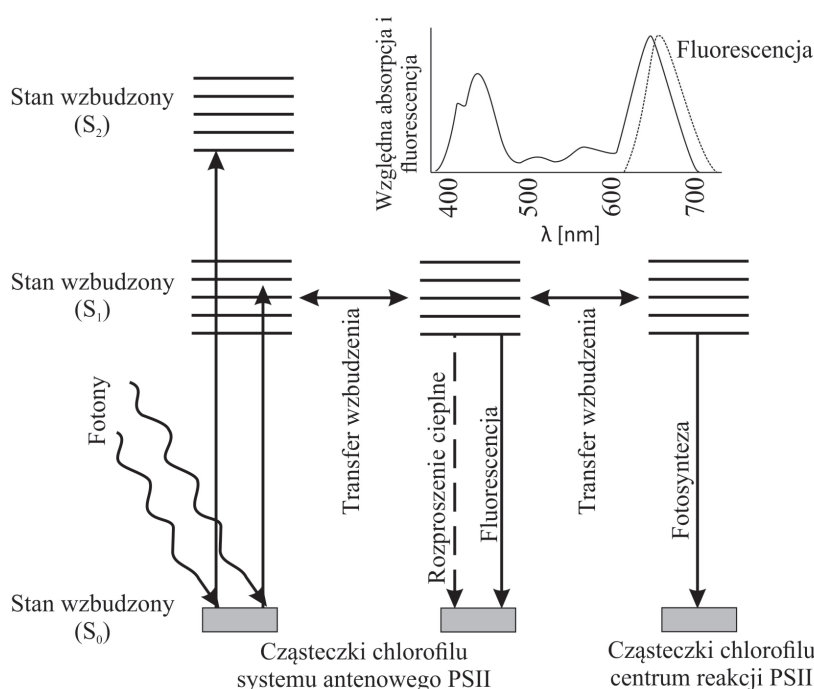
Emisję promieniowania świetlnego cząsteczek chemicznych można wywołać m.in. mechanicznie (tryboluminescencja) i chemicznie (chemiluminescencja). Fotoluminescencja, czyli świecenie wywołane promieniowaniem świetlnym, dzielona jest ze względu na czas istnienia zjawiska na fluorescencję (do 10^{-8} s) oraz fosforescencję (powyżej 10^{-8} s). Fluorescencja chlorofilu *a* powstaje podczas powrotu elektronów cząsteczki barwnika, wzbudzonych przez fotony światła, do poziomu podstawowego. Dochodzi do przejścia elektronów z wyższego poziomu energetycznego na niższy z utratą energii w postaci promieniowania świetlnego (Ryc. 1) (ROSE-NQVIST i VAN KOOTEN 2003).

Wartość fluorescencji chlorofilu *a* jest bardzo niska, nie przekracza 2% całkowitego światła zaabsorbowanego przez roślinę (MAXWELL i JOHNSON 2000). Badanie *in vivo* fluorescencji chlorofilu *a* jest szeroko rozpowszechnioną metodą analizy wydajności fotosyntetycznej fotoukładu II roślin poddanych działaniu abiotycznych i biotycznych czynników stresowych. Dzięki miniaturyzacji narzędzi pomiarowych, fluorymetrów, możliwe jest wykonywanie pomiarów w warunkach laboratoryjnych i polowych. Analiza fluorescencji chlorofilu *a* może być bardzo szybkim i precyzyjnym indykatorem nieprawidłowości w funkcjonowaniu aparatu fotosyntetycznego, szczególnie w połączeniu z innymi nieinwazyjnymi metodami pomiarowymi, np. wymiany gazowej, zawartości barwników asymilacyjnych, temperatury liści, przewodności szparkowej liści.

HISTORIA ODKRYCIA FENOMENU FLUORESCENCJI

Zjawisko fotoluminescencji jest znane od kilku wieków. Nicolas Monardes, hiszpański lekarz i botanik, w 1565 r. jako pierwszy zauważył zjawisko luminescencji diuretyku *Lignum nephriticum*. Lek był bichromatycznym, wodnym ekstraktem drzewa tropikalnego *Pterocarpus indicus*, który po oświetleniu przybierał barwę żółtą, odbijając niebieski refleks świetlny (patrz GOVINDJEE 2004). *L. nephriticum* badało wielu naukowców, m.in. Robert Boyle'a, brytyjski chemik i fizyk, który w 1664 r. zauważył zanik specyficznej barwy po dodaniu do roztworu

kwasu; fenomen fluorescencji nie był jeszcze rozumiany. Vincenzo Casciarolo, boloński szewc, w 1603 r. odkrył minerał, który po ogrzaniu emitował purpurowo-niebieskie światło. Kamień Boloński zainteresował Galileo Galilei, twórcę podstaw współczesnej fizyki, który w 1612 r. opisał obserwowaną emisję światła jako znaną współcześnie fosforescencję (patrz AL-RAWASHDEH 2012). Francuscy chemicy, Pierre Joseph Pelletier i Joseph Bienaimé Caventou, w 1817 r. nazwali chlorofilem zielony ekstrakt alkoholowy liści (patrz KRASNOVSKY 2003). Po raz pierwszy nieświadomie zjawisko luminescencji chlorofilu zaobserwował szkocki fizyk David Brewster. Naukowiec w 1834 r. odkrył jaskrawo czerwone zabarwienie alkoholowego ekstraktu liści laurowych (*Laurus nobilis*) w trakcie oświetlania go wiązką intensywnego światła słonecznego (patrz GOVINDJEE 2004). Profesor matematyki Uniwersytetu w Cambridge, George Gabriel Stokes, w 1852 r. dokonał przełomowego odkrycia. Naukowiec w oparciu o badania Henriego Becquerela z 1842 r., francuskiego fizyka, nad luminescencją siarczanu wapnia w świetle ultrafioletowym, oraz Johna Fredericka Williama Hershela z 1845 r., angielskiego fizyka i chemika, nad fluorescencją siarczanu chininy, skonstruował układ, którego źródłem światła były promienie słoneczne przenikające przez fioletową szybę, butelkę z roztworem bezbarwnej chininy i lampkę do wina z żółtego szkła. Stokes zauważył zmianę zabarwienia transparentnej chininy na niebiesko pod wpływem promieni ultrafioletowych. Zjawisko to Stokes nazwał po raz pierwszy fluorescencją będącą wynikiem przesunięcia widma emisyjnego względem widma absorpcji w stronę fal dłuższych (przesunięcie Stokesa). Prawdopodobnie, także jako pierwszy zaobserwował fluorescencję fikobilin i chlorofilu *a* u alg czerwonych (patrz GOVINDJEE 1995). W 1864 r. Stokes zasugerował, aby fluorescencja była narzędziem analitycznym. Niemiecki naukowiec Müller w 1874 r. zauważył niższą intensywność fluorescencji chlorofilu w liściach niż w jego ekstraktach. KAUTSKY i HIRSCH w 1931 r. stwierdzili, że w czasie kilku minut po oświetleniu próby, sygnał fluorescencji chlorofilu szybko osiąga maksimum, następnie ulega obniżeniu do osiągnięcia stanu równowagi (indukcja krzywej fluorescencji). Wybitny polski fizyk JABŁOŃSKI (1933) opublikował na łamach „Nature” schemat wewnątrzcząsteczkowych procesów redystrybucji i dyspersji energii wzbudzenia cząsteczki chemicznej po absorpcji energii fotonu (m.in. fluorescencja, fosforescencja). W latach 60-70. XX w. nastąpił intensywny rozwój badań fluorescencji chlorofilu *a*. W 1986 r. zbudowano pierwszy



Ryc. 1. Model wykorzystania energii zaabsorbowanej przez fotosystem II. (wg ROSENQVIST i KOOTEN 2003, zmieniona)

fluorymetr wykonujący pomiary w technologii PAM (ang. pulse-amplitude modulation) (patrz SCHREIBER 2004). BJORKMAN i DEMMIG w 1987 r. wykazali, że stosunek wartości F_v/F_m charakteryzuje wydajność z jaką PSII absorbuje energię świetlną. Obecnie, technika pomiaru fluorescencji chlorofilu *a*, dzięki miniaturyzacji fluorymetrów oraz wzrostowi ich dokładności, znajduje coraz szersze zastosowanie praktyczne.

FLUORESCENCJA CHLOROFILU *a*

Cząsteczki chlorofilu absorbują światło widzialne o długościach fal odpowiadających barwie niebieskiej i czerwonej; fluorescencja chlorofilu następuje tylko w widmie światła czerwonego (Ryc. 1). Liście w warunkach fizjologicznych emitują sygnał fluorescencji, z której 90% pochodzi z cząsteczek chlorofilu *a* fotoukładu II (GITELSON i współaut. 1998). Energia wzbudzenia cząsteczek chlorofilu *b* jest szybko i wydajnie przekazywana do chlorofilu *a* skutkując brakiem emisji fluorescencji (PAPAGEORGIU 1975). Fluorescencja fotoukładu I w temperaturze pokojowej najczęściej nie jest uwzględniana (GOVINDJEE 2004). W 2013 r. zaproponowano sposób skorygowania pomiarów fluorescencji w temperaturze pokojowej z wykorzystaniem fluorescencji PSI (PFÜNDEL i współaut. 2013).

Energia świetlna zaabsorbowana przez cząsteczki chlorofilu *a* jest głównie wykorzystana w czasie procesów fotochemicznych

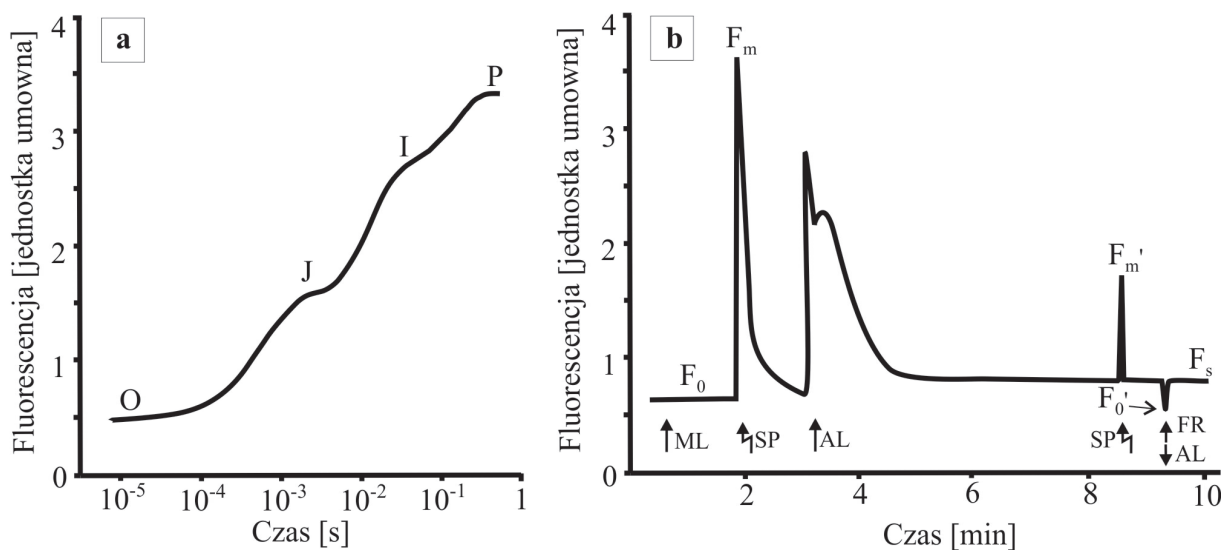
(80%), a jej nadmiar ulega wypromieniowywaniu w postaci fluorescencji (2-5% całkowitego zaabsorbowanego światła) i ciepła, bądź może być przekazana do sąsiednich kompleksów barwnikowych (Ryc. 1) (MAXWELL i JOHNSON 2000, GOVINDJEE 2004). Trzy pierwsze procesy konkurują ze sobą, tzn. wzrost wartości jednego z nich skutkuje spadkiem dwóch pozostałych (MAXWELL i JOHNSON 2000).

Oświetlone ciągłą wiązką światła, zaadaptowane do ciemności liście bądź zawiesiny komórek roślin wyższych, glonów i sinic wykazują charakterystyczną zmianę intensywności emisji fluorescencji chlorofilu *a* nazywaną indukcją fluorescencji (STIRBET i GOVINDJEE 2011). Rośliny wyższe oraz glony charakteryzują się szybką (od μ s do 1 s) i wolną (od sekund do kilkudziesięciu minut) fazą indukcji fluorescencji chlorofilu *a* (Ryc. 2) (PAPAGEORGIU i GOVINDJEE 2011). Sygnał fluorescencji jest wprost proporcjonalny do intensywności światła wzbudzenia cząsteczek chlorofilu (STRASSER i współaut. 2000).

Fluorescencja chlorofilu *a* w temperaturze pokojowej jest badana głównie dwiema metodami: przy użyciu pojedynczego impulsu intensywnego światła wysycającego (test OJIP) bądź wykorzystując wielokrotne impulsy słabego światła modulowanego o dużej częstotliwości oraz dodatkowe źródła światła aktywnego, wysycającego i dalekiej czerwieni (SCHREIBER i współaut. 1986, STRASSER i GOVINDJEE 1991). Inne, znacznie rzadziej stosowane techniki, tj. P&P (ang. pump and probe), PDP (ang. pump during probe), FRRF (ang. fast repetition rate), FIRE (ang. fluorescence induction and relaxation), umożliwiają m.in. badanie fitoplanktonu i glonów żyjących w symbiozie z koralowcami (RÖTTGERS 2007, ZHAO i YU 2014).

FLUORESCENCJA SZYBKĄ (TEST OJIP)

Analiza krzywej indukcji OJIP umożliwia zrozumienie zależności pomiędzy strukturą a funkcją aparatu fotosyntetycznego oraz oszacowanie witalności roślin (STRASSER i współaut. 2000, 2004). Test OJIP polega na pomiarze serii sygnałów fluorescencji chloro-

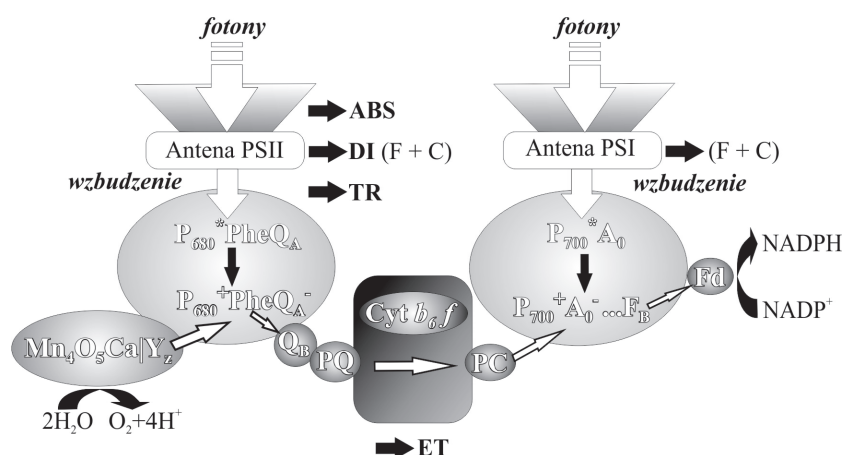


Ryc. 2. Krzywa indukcji fluorescencji: a) szybkiej, b) modulowanej liści pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.). Opis oznaczeń w Tabeli 1.

filu w krótkich odstępach czasowych tworzących krzywą w logarytmicznej funkcji czasu o charakterystycznych punktach przegięcia oznaczonych literami O, J, I, P (Ryc. 2a). Pod wpływem stresu, np. wysokiej temperatury, wysokiego natężenia światła czy deficytu azotu, dochodzi do zaburzeń w obrębie PSII i zahamowania transportu elektronów pomiędzy kompleksem uwalniającym tlen (ang. oxygen evolving complex, OEC) a tyrozyną (STRASSER i współaut. 2004). W wyniku nieprawidłowości, w czasie 200-300 μ s, powstaje dodatkowe, lokalne maksimum na krzywej szybkiej indukcji fluorescencji chlorofilu *a* PSII, nazywane punktem K (patrz KALAJI 2011). Charakterystyczny fragment krzywej indukcji obserwowany jest również u roślin rosnących naturalnie w suchym i gorącym środowisku, np. *Cycus revoluta*, *Permelia* sp., *Juniperus* sp. (SRIVASTAVA i STRASSER 1997).

Test OJIP jest oparty głównie o tezy DUYSENSA i SWEERSA (1963). Autorzy stwierdzili, że źródłem fluorescencji chlorofilu *a* jest fotosystem II. Hipoteza badaczy zakładała otwarcie centrów reakcji PSII (pełne utlenienie puli Q_A) próby fotosyntetycznej zaadaptowanej do ciemności powodujące minimalny sygnał fluorescencji w punkcie O, oraz zamknięcia centrów reakcji PSII (pełna redukcja puli Q_A) po oświetleniu próby intensywną i wysycającą wiązką światła skutkującą maksymalnym sygnałem fluorescencji w punkcie P. Wzrost intensywności fluorescencji od punktu O do P jest na tyle szybki, że nie powoduje istotnych zmian fizjologicznych aparatu fotosyntetycznego (STIRBET i GOVINDJEE 2011). Udowodniono, że dla prób

adaptowanych do ciemności bądź poddanych stresowi wysokiej temperatury strumień fotonów zaabsorbowany przez PSII nie zawsze w pełni redukuje pulę Q_A (TÓTH i współaut. 2007, SCHANSKER i współaut. 2008). Uważa się, że niski i stały sygnał fluorescencji chlorofilu *a* pochodzący z PSI w temperaturze pokojowej roślin może być pomijany (STIRBET i GOVINDJEE 2011). Wszystkie jednostki PSII są homogeniczne i aktywne fotochemicznie; wyjątek stanowią tzw. ciche centra reakcji pojawiające się pod wpływem krótkotrwałego oświetlenia próbki bądź pod wpływem stresów abiotycznych, np. wysokiej temperatury (TSIMILLI-MICHAEL i współaut. 1998). Pomimo że całkowity sygnał fluorescencji pochodzi z kompleksu antenowego PSII, organizacja cząsteczek barwnikowych i funkcja barwników towarzyszących (np. chlorofil *b*, karotenoidy, fikobiliny) są ignorowane (STIRBET i GOVINDJEE 2011). Wykazano, że (poza wyjątkami) centra reakcji PSII są niezależne i niepołączone ze sobą (PAILLOTIN 1976, STRASSER 1978, JOLIOT i JOLIOT 2003). Ponadto, istnieją metody obliczeniowe weryfikujące niezależność centrów reakcji PSII (STIRBET i współaut. 1998). Całkowity strumień fotonów zaabsorbowany przez cząsteczki barwnikowe systemu antenowego PSII (ABS) ulega częściowemu rozproszeniu (DI) w postaci ciepła i fluorescencji (F), pozostała część energii świetlnej uwięziona w centrach reakcji PSII (TR) redukuje całą pulę akceptora elektronów Q_A do Q_A prowadząc do indukcji łańcucha transportu elektronów (ET) z Q_A do Q_B (ET_0) oraz dalej do akceptorów PSI (RE_0) (Ryc. 3) (TSIMILLI-MICHAEL i współaut. 1998, STRASSER i współaut. 2010). Wykaza-



Ryc. 3. Schemat fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów z uwzględnieniem wybranych parametrów fluorescencji chlorofilu *a*.

ABS – absorpcja fotonów przez cząsteczki chlorofilu PSII, DI – rozproszenie zaabsorbowanej energii w postaci fluorescencji (F) oraz promieniowania ciepłego (C), energia uwięziona przez centra aktywne PSII (TR) wykorzystana do procesu separacji ładunku (formowania $P_{680}^+ PheQ_A^-$), ET – przepływ odseparowanych od cząsteczki wody elektronów do ferredoksyny (Fd) bądź ewentualnie $NADP^+$, Cyt *b₆f* – kompleks cytochromu *b₆f*, Q_B – plastochinon B, PQ – plastocyanina. (Zmodyfikowane wg STIRBET i GOVINDJEE 2011).

no, że podczas wzrostu sygnału fluorescencji do punktu J (około 2 ms) Q_A redukowany jest tylko jednokrotnie, nie może być ponownie utleniony (STRASSER i STRASSER 1995).

Procesy fotosyntezy i fluorescencji są ze sobą ściśle powiązane. Krzywa indukcji szybkiej fluorescencji chlorofilu *a* składa się z trzech podstawowych faz: O-J odzwierciedlającej redukcję plastochinonu Q_A na akceptorowej stronie PSII, J-I związanej z redukcją przenośników elektronów (Q_B , PQ, Cyt, PC) oraz I-P obrazującej redukcję przenośników elektronów na akceptorowej stronie PSI (akceptorów pośrednich, Fd i $NADP^+$) (KALAJI 2011). Charakterystyczne odcinki krzywej szybkiej indukcji chlorofilu *a* wyznaczone są etapami: J, przejście cząsteczek PQ ze stanu zredukowanego w stan utleniony; I, ponowne utlenienie PQH_2 przez Cyt; P, inaktywacja reduktazy ferredoksyny $NADP^+$ (FNR) (KALAJI 2011). Intensywne oświetlenie próby prowadzi do powstania fazy fotochemicznej (około 2 ms) obserwowanej jako charakterystyczny odcinek krzywej fluorescencji pomiędzy punktami O i J. Kolejne odcinki krzywej, J-I oraz I-P, odpowiadają fazie zależnej od temperatury (zwłaszcza fragment krzywej I-P) (Ryc. 2a).

Test OJIP jest bardzo czuły na stres powodowany zmianą czynników środowiskowych t.j.: intensywność oświetlenia, temperatura otoczenia, susza, poziom ozonu oraz CO_2 w powietrzu (STRASSER i współaut. 2004).

Większość komercyjnie dostępnych fluorymetrów, po oświetleniu próby adaptowanej do ciemności ciągłym impulsem światła,

rejestruje z dużą dokładnością zmiany intensywności fluorescencji chlorofilu *a*. Przykładem urządzenia wykonującego pomiary w tej technice jest PocketPEA (Hansatech). Aparat rejestruje intensywność fluorescencji w odstępach co 10 μs do 300 μs , następnie z mniejszą częstotliwością, główne pomiary wykonuje po 50 μs , 100 μs , 300 μs , 2 ms, 30 ms oraz 1 s od oświetlenia próby. Analiza krzywej szybkiej indukcji fluorescencji chlorofilu *a* dostarcza wielu informacji (Tabela 1), z których najczęściej używane to: (i) podstawowe wskaźniki fluorescencji, (ii) wydajności kwantowe/prawdopodobieństwa/indeksu wydajności, (iii) oszacowanie przepływu energii przez PSII w przeliczeniu na centrum reakcji (CR) lub powierzchnię próby (CS).

FLUORESCENCJA MODULOWANA

Fluorescencja modulowana (PAM) jest jedną z technik pomiaru luminescencji chlorofilu *a*. Fluorymetry wykorzystujące tę metodę emitują na powierzchnię próbki fotosyntetycznej modulowane impulsy światła (włączane i wyłączane z dużą częstotliwością), jednocześnie rejestrując sygnał fluorescencji wzbudzonych cząsteczek chlorofilu *a* w PSII. Zastosowane rozwiązanie techniczne umożliwia rejestrowanie sygnału fluorescencji z ominięciem zakłóceń świetlnych pochodzących z otoczenia (BLANKENSHIP 2014). Dzięki użyciu modulacji nie ma konieczności adaptowania prób do ciemności, pomiary można wykonywać w warunkach polowych w pełnym świetle słonecznym. Aparaty wy-

Tabela 1. Rodzaje źródeł oświetlenia próby oraz parametry fluorescencji szybkiej i modulowanej chlorofilu *a*.

Typ użytego źródła światła	D₀/ABS	- maksymalna wydajność kwantowa niefotochemicznego wygaszania fluorescencji
ML - światło modulowane	PI_{ABS}	- wskaźnik wydajności obliczony na podstawie absorpcji energii
AL - światło aktywnicze	S_m	- znormalizowana powierzchnia całkowita nad wykresem szybkiej indukcji fluorescencji
FR - światło dalekiej czerwieni		
SP - impuls światła wysycającego		
Podstawowe wskaźniki fluorescencji chlorofilu a		
F₀ - fluorescencja minimalna próby adaptowanej do ciemności	Oszacowanie przepływu energii w przeliczeniu na centrum reakcji (RC)	
F₀' - fluorescencja minimalna próby adaptowanej do światła	ABS/RC	- przepływ strumienia fotonów zaabsorbowanego przez cząsteczki chlorofilu anten PSII w przeliczeniu na RC
F_m - fluorescencja maksymalna próby adaptowanej do ciemności	TR₀/RC	- przepływ fotonów zatrzymanych (redukujących Q _A) w PSII w przeliczeniu na RC
F_m' - fluorescencja maksymalna próby adaptowanej do światła	ET₀/RC	- przepływ elektronów za Q _A w przeliczeniu na RC
F_v - fluorescencja zmienna próby adaptowanej do ciemności	RE₀/RC	- przepływ elektronów redukujących akceptory PSI w przeliczeniu na RC
F_v' - fluorescencja zmienna próby adaptowanej do światła		
F_s - fluorescencja stała próby adaptowanej do światła		
Area - powierzchnia całkowita nad wykresem szybkiej indukcji fluorescencji		
O, J, I, P - charakterystyczne punkty przegięcia krzywej indukcji fluorescencji szybkiej,	Oszacowanie przepływu energii w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię próbki (CS) fotosyntetycznie czynnej	
	ABS/CS	- przepływ strumienia fotonów zaabsorbowanego przez cząsteczki chlorofilu anten PSII w przeliczeniu na CS
Wydajności kwantowe / prawdopodobieństwa/ indeksy wydajności	TR₀/CS	- przepływ fotonów zatrzymanych (redukujących Q _A) w PSII w przeliczeniu na CS
F_v/F_m - maksymalna wydajność kwantowa próby adaptowanej do ciemności	ET₀/CS	- przepływ elektronów za Q _A w przeliczeniu na CS
TR₀/ABS - maksymalna wydajność kwantowa procesu zatrzymywania fotonu (redukującego Q _A) w centrum reakcji PSII	RE₀/CS	- przepływ elektronów redukujących akceptory PSI w przeliczeniu na CS
ET₀/ABS - maksymalna wydajność kwantowa transportu elektronów		
RE₀/ABS - wydajność kwantowa redukcji akceptorów elektronów PSI	Parametry fluorescencji modulowanej	
ET₀/TR₀ - prawdopodobieństwo włączenia fotonu zatrzymanego (redukującego Q _A) w centrum reakcji PSII do łańcucha transportu elektronów	NPQ	- niefotochemiczne wygaszanie fluorescencji
RE/TR - prawdopodobieństwo transportu elektronu do akceptorów	qP	- fotochemiczne wygaszanie fluorescencji
RE₀/ET₀ - prawdopodobieństwo przeniesienia elektronu ze zredukowanego akceptora międzysystemowego na akceptor końcowy PSI	Φ_{PSII}	- aktualna wydajność kwantowa PSII
	ΔF/F_m'	- efektywna wydajność kwantowa procesów fotochemicznych
	ETR	- współczynnik transportu elektronów

korzystające technikę fluorescencji modulowanej, np. PAM-2500 (Walz), posiadają możliwość zaprogramowania sekwencji włączania i wyłączenia światła (i) aktywnicznego (AL), uruchamiającego łańcuch transportu elektronów; (ii) wysycającego (SP), zamykającego centra reakcji; (iii) dalekiej czerwieni (FR), utleniającego pulę Q_A związanego z PSII oraz preferencyjnie wzbudzającego PSI (Tabela 1). Badanie jednej próby fotosyntetycznej z wykorzystaniem metody fluorescencji modulowanej może trwać nawet kilkadziesiąt minut. Po oświetleniu, np. powierzchni liścia zaadaptowanego do ciemności, stopniowo dochodzi do zamykania centrów reakcji PSII wywołując maksymalny sygnał fluorescencji. W czasie kilku minut od osiągnięcia F_m obserwuje się stopniowe obniżenie intensywności fluorescencji. Zjawisko tłumaczone jest dwójako: wzrostem intensywności transportu elektronów poza PSII prowadzącym do aktywacji enzymów związanych z metabolizmem węgla (wygaszanie fotochemiczne) oraz rozproszaniem zgromadzonej energii w postaci ciepła (NPQ, wygaszanie niefotochemiczne) (MAXWELL i JOHNSON 2000). Oba procesy ze sobą konkurują.

Pomiar fluorescencji modulowanej chlorofilu *a* próby adaptowanej do ciemności najczęściej przebiega zgodnie ze schematem: (i) uruchomienie słabego źródła światła modulowanego (około 0,1 μmol m⁻² s⁻¹), pomiar F₀, (ii) włączenie pojedynczego impulsu światła wysycającego (np. 3000 μmoli fotonów m⁻² s⁻¹), pomiar F_m, (iii) powrót sygnału fluorescencji do wartości minimalnej, włączenie światła aktywnicznego (np. 150 μmoli fotonów m⁻² s⁻¹) uruchamiającego procesy fotochemiczne, (iv) osiągnięciu stanu równowagi sygnału fluorescencji (F_s), włączenie pojedynczego impulsu światła wysycającego (np. 3000 μmoli fotonów m⁻² s⁻¹), pomiar F_m', (v) powrót sygnału fluorescencji do poziomu F_s, wyłączenie światła aktywnicznego, włączenie dalekiej czerwieni i pomiar F₀' (Ryc. 2b).

Rośliny zaadaptowane do ciemności wykazują maksymalną wartość wygaszania fotochemicznego i minimalną wygaszania niefotochemicznego (SCHREIBER 2004). Próba zaadaptowana do ciemności, po wzbudzeniu słabymi impulsami światła modulowanego niewzbudzającymi istotnie centrów reakcji PSII, wykazuje niski poziom fluorescencji (F₀) (BLANKENSHIP 2014). Rolą impulsu światła wysycającego w obecności światła aktywnicz-

nego jest pomiar fluorescencji maksymalnej próby przystosowanej do światła (F_m'), której wartość jest niższa niż próby przystosowanej do ciemności. Obserwowana prawidłowość nie świadczy o różnicy w ilości Q_A , ponieważ w obu przypadkach impuls światła wysycającego w pełni redukuje pulę Q_A . Obniżona wartość F_m świadczy o większym udziale procesów fotochemicznych konkurujących o wykorzystanie energii wzbudzenia centrów reakcji PSII (BLANKENSHIP 2014). Zastosowanie światła dalekiej czerwieni selektywnie wzbudzającego fotosystem I względem fotosystemu II, usuwa ładunek ujemny z akceptorów elektronów w PSII. Daleka czerwień skutecznie otwiera centra reakcji umożliwiając określenie parametru F_0' , ale niestety doprowadza również do nieprawidłowości w procesie wygaszania niefotochemicznego (BAKER i ROSENQVIST 2004). Zmiany intensywności wolnej fluorescencji chlorofilu *a* mogą być skutkiem zaburzeń wykorzystania energii fotochemicznej, niefotochemicznego rozproszenia energii oraz nieprawidłowościami dystrybucji energii pomiędzy fotosystemami (SCHREIBER 2004).

Istnieje kilka parametrów charakteryzujących proces wygaszania fotochemicznego, z których najczęściej używane to: Φ_{PSII} , qP , F_v/F_m (Tabela 1). Maksymalna wydajność kwantowa fotoukładu II (Φ_{PSII}) mierzy proporcję zaabsorbowanego światła przez cząsteczki chlorofilu PSII wykorzystaną w czasie procesów fotochemicznych (oszacowuje fotosyntezę) (GENTY i współaut. 1989). Badania laboratoryjne dowodzą, że istnieje silna zależność pomiędzy Φ_{PSII} i zdolnością próby fotosyntetycznej do wiązania CO_2 , jednak nie jest ona spełniona dla badań w warunkach stresowych z powodu zmian, np. w pseudocyklicznym transporcie elektronów (FRYER i współaut. 1998). Kolejnym parametrem wygaszania fotochemicznego jest qP , który oszacowuje proporcję otwartych centrów reakcji PSII (SCHREIBER i współaut. 1986). Najpowszechniej stosowanym parametrem jest F_v/F_m charakteryzujący maksymalną wydajność kwantową PSII, która u większości roślin wyższych w warunkach fizjologicznych przyjmuje wartości od 0,78 do 0,84 (BJORKMAN i DEMMIG 1987). Istnieje zależność pomiędzy parametrami określającymi wygaszanie fotochemiczne opisana równaniem $F_v/F_m = \Phi_{PSII}/qP$ (GENTY i współaut. 1989).

Parametrem określającym wygaszanie niefotochemiczne jest NPQ (BILGER i BJORKMAN 1990). Wskaźnik najczęściej przyjmuje wartości od 0,5 do 3,5 i jest ściśle powiązany z rozproszeniem cieplnym (MAXWELL i JOHNSON 2000). NPQ oblicza się wykorzystując wartości fluorescencji maksymalnej próby fotosyntetycznej przystosowanej do ciemności

(F_m) i do światła (F_m'). Bezpośrednie porównywanie NPQ, np. pomiędzy liśćmi roślin rosnącymi w różnych warunkach środowiska bądź liśćmi różnych gatunków, może prowadzić do niejednoznacznych wniosków. Uważa się, że jeżeli wartość F_v/F_m roślin zaadaptowanych do ciemności jest znacząco różna nie powinno się wykonywać bezpośrednich porównań NPQ (MAXWELL i JOHNSON 2000).

OBRAZOWANIE FLUORESCENCJI

Jedną z metod badania fluorescencji chlorofilu *a* jest jej obrazowanie (ang. chlorophyll fluorescence imaging, CFI) z wykorzystaniem zaawansowanych technik emisji światła, detekcji obrazu oraz przetwarzania danych. Systemy CFI umożliwiają obserwowanie fluorescencji na poziomie komórek w wysokiej rozdzielczości, liścia/rośliny w niskiej rozdzielczości, a także pól uprawnych z wykorzystaniem zdalnych detektorów (GORBE i CALATAYUD 2012). Metoda jest używana głównie do badania zmian fluorescencji w całych liściach, których nie można zaobserwować opierając się wyłącznie o techniki testu OJIP lub PAM. BARBAGALLO i współaut. (2003) zaprezentowali sposób wykorzystania techniki CFI do szybkiego i wydajnego obrazowania fluorescencji siewek *Arabidopsis* oraz *Agrostis tenuis* na płytce do mikroteatów. Oświetlenie próby promieniowaniem widzialnym lub UV przez: pulsującą wiązkę lasera, pulsującym oświetleniu konwencjonalnym lub diodami LED, powoduje wzbudzenie cząsteczek chlorofilu, które jest rejestrowane na matrycy CCD urządzenia (CHAERLE i VAN DER STRAETEN 2001). Metoda CFI pozwala na jednoczesne rejestrowanie fluorescencji w czterech zakresach spektralnych (maksimum bądź wartości bliskie maksimum widma emisyjnego): niebieskim (440 nm), zielonym (520 nm), czerwonym (690 nm) oraz dalekiej czerwieni (740 nm) (BUSCHMANN i współaut. 2009). Źródłem fluorescencji barwy (i) zielono-niebieskiej są kwasy cynamonowe (najczęściej kwas ferulowy obecny w ścianie komórkowej), (ii) barwy zielonej kwercytyna, berberyna oraz w pewnych przypadkach ryboflawina i zredukowany fillochinon K_1 (H_2), a (iii) barwy czerwonej i dalekiej czerwieni cząsteczki chlorofilu *a* systemu antenowego PSII chloroplastów komórek mezofilowych (BUSCHMANN i współaut. 2000). Fluorescencja dalekiej czerwieni w temperaturze pokojowej pochodzi szczytkowo z chlorofilu *a* związanego w PSI (BUSCHMANN i współaut. 2009). Obrazowanie fluorescencji przekroju poprzecznego liścia uwidacznia niejednorodną fotoluminescencję jego wnętrza. Ściany komórkowe obecne w warstwie epidermy wywołują silny sygnał fluorescencji

niebieskiej i zielonej. Chlorofile i karotenoidy nie są obecne w komórkach epidermy, z wyjątkiem aparatów szparkowych. Mięksisz palisadowy i gąbczasty są źródłem fluorescencji czerwonej i dalekiej czerwieni, sygnał niebiesko-zielonej fluorescencji ścian komórkowych tych tkanek jest bardzo niski (BUSCHMANN i współaut. 2000). Zmiany emisji fluorescencji lub jej proporcji (np. niebieskiej/czerwonej) mogą być wskaźnikami stresu roślin bądź oszacowaniem zawartości chlorofilu (BUSCHMANN i LICHTENTHALER 1998). Obrazowanie fluorescencji pozwala na pomiar parametrów wygaszania fotochemicznego i niefotochemicznego w obecności światła aktywnego (GORBE i CALATAYUD 2012)

ZASTOSOWANIE POMIARU FLUORESCENCJI CHLOROFILU *a* W BADANIACH STRESU ROŚLIN

Fluorescencja chlorofilu *a* *in vivo* jest powszechnie używaną metodą badania wpływu stresowych czynników abiotycznych (promieniowanie, chłód, wysoka temperatura, zasolenie, niedobór pierwiastków, uszkodzenie) oraz biotycznych (aktywność innych organizmów) na funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego. Rośliny, pod wpływem niekorzystnych warunków środowiskowych, wytwarzają dużą ilość reaktywnych form tlenu (RFT). Początkowo sugerowano, że fotouszkodzenie PSII może być efektem bezpośredniego działania RFT na białko D1 z centrum reakcji fotoukładu II (KEREN i współaut. 1997), jednak późniejsze badania wykazały, że RFT nie są zaangażowane w fotouszkodzenie PSII, lecz mogą wpływać na jego naprawę (NISHIYAMA i MURATA 2014). Podwyższony poziom H_2O_2 i 1O_2 może hamować translację zarówno białka D1, jak i innych białek tylakoidowych (NISHIYAMA i współaut. 2006).

Rośliny wykształciły wiele mechanizmów chroniących fotosystemy przed zmiennymi warunkami środowiska. Reakcja na poziomie całej rośliny bądź liścia może pojawić się w czasie tygodni lub miesięcy, podczas gdy na poziomie molekularnym w czasie sekund/minut od zaistnienia czynnika stresowego (DROŻAK i ROMANOWSKA 2006). Komercyjnie dostępne fluorymetry umożliwiają różnorodne zastosowanie tej techniki. Fotoluminescencja chlorofilu jest najczęściej wykorzystywana w badaniach laboratoryjnych. Techniki pomiaru fluorescencji chlorofilu *a* znajdują także zastosowanie przy monitoringu ekosystemów, fenotypowaniu, produkcji roślin uprawnych i ozdobnych. Należy zauważyć, że wyniki tych pomiarów nie identyfikują jednoznacznie charakteru stresu, mogą natomiast być wykorzystywane jako kryteria selekcji w hodowli roślin (STARCK 2014).

Fenotypowanie pozwala na zaobserwowanie wpływu wybranego wariantu genetycznego (genotypu) roślin na ich cechy (fenotyp) podczas interakcji z różnorodnymi czynnikami środowiska. Technika pomiaru fluorescencji chlorofilu *a* jest coraz częściej wykorzystywana do bezinwazyjnego, szybkiego oraz masowego określenia, w jakim stopniu poszczególne odmiany roślin uprawnych są mniej lub bardziej przystosowane do wybranego stresu. Jednym z najbardziej spektakularnych przykładów fenotypowania z wykorzystaniem fluorescencji chlorofilu jest jej globalne mapowanie z wykorzystaniem zdjęć satelitarnych (http://www.nasa.gov/press/goddard/2014/march/satellite-shows-high-productivity-from-us-corn-belt/#.VPCWc_mG-8I). Zastosowanie tej innowacyjnej metody dostarcza wielu informacji o wegetacji, pozwala zaobserwować początkowe objawy stresu roślin jeszcze przed widoczną redukcją zawartości chlorofilu w liściach (JOINER i współaut. 2011).

Zbyt wysokie lub niskie natężenie światła fotosyntetycznie czynnego może być czynnikiem stresowym roślin. Pod wpływem wysokiego natężenia światła dochodzi do obniżenia pH wnętrza tylakoidów, co prowadzi do protonacji białka PsbS, podjednostki fotosystemu II odgrywającej kluczową rolę w procesie wygaszania niefotochemicznego fluorescencji (NPQ) i powstawaniem zeaksantyny z wiolaksantyny w cyklu ksantoflowym, głównym mechanizmie chroniącym PSII przed fotouszkodzeniem (HOLT i współaut. 2005, KISS i współaut. 2008). DROŻAK i ROMANOWSKA (2006) wykazały obniżenie wartości F_v/F_m kukurydzy rosnącej przy wysokim natężeniu światła. Autorki zaobserwowały również najniższą wartość NPQ roślin rosnących przy niskim natężeniu promieniowania fotosyntetycznego w obecności wzrastającego oświetlenia aktywnego. COSTA i współaut. (2015) wykazali obniżenie wartości F_v/F_m , $\Delta F/F_m'$ oraz podwyższenie NPQ, ETR w liściach drzewa *Hymenaea stigonocarpa* przy intensywnym naturalnym świetle dziennym. Otrzymane wyniki świadczą o niskim poziomie ochrony PSII przed stresem wysokiego natężenia promieniowania PAR. Autorzy zaobserwowali, że mechanizmy rozproszenia nadmiaru zaabsorbowanej energii w postaci ciepła nie zapobiegają wystarczająco fotoinhibicji. Stres roślin wywołany niską i wysoką temperaturą uszkadza błonę tylakoidów, która przejawia się obniżeniem transportu elektronów bezpośrednio ograniczając aktywność fotosyntetyczną. Szybkość powstawania i zakres uszkodzeń zależą od zmian temperatury i czasu jej działania. Szczególnie szkodliwe są nagłe wahania temperatury (szok termiczny), im

większe tym zakres uszkodzeń jest szerszy (KACPERSKA 2012). RAPACZ (2007) zaobserwował znaczący spadek F_v/F_m w liściach pszenicy ozimej po obniżeniu temperatury otoczenia do -2°C . Autor wykazał, że aparat fotosyntetyczny *T. aestivum* nie odzyskuje pełnej aktywności po powrocie do temperatury podczas wzrostu. LI i współaut. (2015) symulowali wpływ ocieplenia klimatu na tolerancję stresu niskiej temperatury pszenicy ozimej. Jeden z wariantów eksperymentu przewidywał podwyższenie temperatury otoczenia w zimowym oraz spadek temperatury w wiosennym okresie wegetacyjnym. Autorzy wykazali obniżenie ET_0/RC charakteryzujący transport elektronów w PSII, co wskazuje na obniżoną tolerancję stresu niskiej temperatury wiosną u roślin, których pierwszy okres wegetacyjny zaburzono podwyższoną temperaturą. DAI i współaut. (2007) zaobserwowali znaczący spadek Φ_{PSII} przy temperaturze otoczenia -8°C i wzrost wartości tego parametru po ustaniu stresu niskiej temperatury u jęczmienia ozimego. Otrzymane wyniki mogą świadczyć o zmianach funkcjonowania łańcucha transportu elektronów w błonie tylakoidów i zdolności do częściowej naprawy PSII po uszkodzeniu termicznym; stopniowe aklimatyzowanie roślin do ujemnej temperatury zwiększa zdolność do zmniejszenia uszkodzeń (DAI i współaut. 2007).

HAQUE i współaut. (2014) wykazali, że stres cieplny znacząco obniża wartość F_v/F_m oraz qP w siewkach pszenicy jarej na różnym etapie rozwoju. Poszczególne odmiany *T. aestivum* różniły się między sobą czasem reaktywacji po obniżeniu temperatury otoczenia. WANG i współaut. (2015) zaobserwowali znaczące obniżenie Φ_{PSII} i wydajności fotosyntezy, a także wzrost NPQ w liściach pszenicy. Otrzymane wyniki świadczą o fotoinhibicji PSII. Tetraploidalne odmiany wiciokrzewu japońskiego (*Lonicera japonica* Thunb.) wykazują mniejsze wahania F_v/F_m , ETR, Φ_{PSII} , qP pomiędzy roślinami kontrolnymi i poddanymi stresowi wysokiej temperatury (LI i współaut. 2011). Autorzy zaobserwowali obniżenie NPQ u odmiany tetraploidalnej oraz odwrotną tendencję u formy diploidalnej. Badania LI i współaut. (2011) nad fluorescencją chlorofilu a świadczą o lepszym przystosowaniu poliploidów do wegetacji w wyższej temperaturze otoczenia.

Dostępność wody jest niezbędnym warunkiem prawidłowego rozwoju roślin łądowych. Długotrwały niedobór lub nadmiar wody w podłożu może skutkować ograniczeniem wzrostu rośliny, utratą turgoru i zrzućaniem liści, a także modyfikacją składu lipidów w błonie, produkcją osmoprotektantów (MISHRA i współaut. 2012, YU i współaut. 2015). LARRÉ i współaut. (2013) zaobserwo-

wali wzrost ABS/RC , TR_0/RC oraz DI_0/RC przy braku zmian TR_0/RC i F_v/F_m w liściach erytryny grzebieniastej (*Erythrina crista-galli* L.) Wyniki świadczą o uruchomieniu mechanizmów chroniących PSII przed fotouszkodzeniem podczas stresu nadmiaru wody w podłożu polegających na rozpraszaniu nadmiaru zaabsorbowanej energii. BERTOLDE i współaut. (2012) wykazali obniżenie F_v/F_m i wzrost F_0 po długotrwałym zalaniu korzeni kakaowca właściwego (*Theobroma cacao* L.) odmiany wrażliwej na zalanie oraz brak zmian u odmiany odpornej na stres wodny. Zalanie korzeni również wpływa negatywnie na kondycję PSII topoli eufrackiej (*Populus euphratica* Oliv.). YU i współaut. (2015) wykazali obniżenie F_v/F_m , któremu towarzyszy wzrost qP i F'_v/F'_m . Autorzy stwierdzili, że *P. euphratica* może przystosowywać się do niekorzystnych warunków środowiska przez uruchamianie mechanizmów zapobiegających fotoinhibicji (np. cyklu ksantofilowego).

Pod wpływem stresu suszy wzrasta prawdopodobieństwo uszkodzenia PSII charakteryzujące się obniżoną wydajnością fotosyntezy i wzrostem rozpraszania zaabsorbowanej energii w formie wygaszania niefotochemicznego (FARALONI i współaut. 2011). MISHRA i współaut. (2012) zaobserwowali istotne obniżenie wartości Φ_{PSII} i wzrost NPQ skorelowane z obniżeniem potencjału wodnego w liściach pomidora (*Solanum lycopersicum* L.). Wartość F_v/F_m nie ulegała zmianom w początkowej fazie eksperymentu. Autorzy stwierdzili, że pod wpływem długotrwałego stresu dochodzi do zamknięcia aparatów szparkowych i hamowania asymilacji CO_2 w liściach.

Źródłem zranienia mechanicznego roślin są czynniki abiotyczne: silny wiatr, grad, intensywne opady śniegu i deszczu, oraz czynniki biotyczne: zgryzanie przez fitofagi, działalność człowieka. Po uszkodzeniu mechanicznym, w komórce generowana jest seria następujących po sobie zmian fizjologicznych i metabolicznych. W miejsce uszkodzenia dochodzi do utraty wody oraz lokalnej śmierci komórek. Rana jest łatwo dostępna dla bakterii i grzybów chorobotwórczych wnikających do systemu wiązek przewodzących rośliny. QUILLIAM i współaut. (2006) w oparciu o technikę obrazowania fluorescencji chlorofilu a liścia *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. zaobserwowali wzrost wartości Φ_{PSII} natychmiast po zranieniu oraz brak różnic Φ_{PSII} , NPQ, F_v/F_m pomiędzy liśćmi kontrolnymi i uszkodzonymi po 24 godzinach. Autorzy publikacji stwierdzili, że komórki o pierwotnie obniżonej wartości Φ_{PSII} , w czasie doby od zranienia obumierają lub w pełni się regenerują. Obserwację zespołu Quilliam częściowo potwierdzają badania pszenicy ozimej

SULKIEWICZA I CIERESZKO (2014), w których stwierdzono nieznaczne, lokalne (tylko w liściu uszkodzonym) obniżenie wartości F_v/F_m w czasie 30, 60 i 90 minut po jego zranieniu. BARRON-GAFFORD i współaut. (2012) wykazali znaczące obniżenie $\Delta F/F_m'$, qP , qN oraz wzrost NPQ tkanek liści *Datura wrightii* Regel bezpośrednio przylegających do uszkodzenia powstałego w wyniku zgryzanych przez larwy *Manduca sexta* L. Badacze stwierdzili trwałe zniszczenie komórek otaczających obszar zranienia. Wartość $\Delta F/F_m'$ wraz ze wzrostem odległości (do 0,25 cm) i czasu (do 75 min.) wykazywała coraz mniejsze różnice pomiędzy roślinami kontrolnymi i uszkodzonymi. Powyżej prezentowane wyniki wskazują, że zmiany parametrów fluorescencyjnych indukowane mechanicznym uszkodzeniem roślin mają charakter wtórny, wynikający z uszkodzenia komórek/chloroplastów.

Pomiary fluorescencji chlorofilu *a* dostarczają wielu informacji o oddziaływaniu stresu na funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego roślin. Analiza oraz interpretacja otrzymanych wyników jest często skomplikowana i pracochłonna, a obecny stan wiedzy jeszcze nie pozwala na jednoznaczny opis zróżnicowanych czynników wywołujących zaburzenia funkcjonowania PSII. Ostatnie dwudziestolecie zaowocowało intensywnym rozwojem metod pomiaru fotoluminescencji chlorofilu *a* oraz miniaturyzacją urządzeń pomiarowych. Fluorymetry często są integrowane z aparatami do pomiaru wymiany gazowej umożliwiając kompleksowe bezinwazyjne zbadanie natężenia procesu fotosyntezy. Zastosowanie technik pomiaru fluorescencji chlorofilu *a* jest coraz bardziej powszechne rozpoczynając od badań pojedynczych komórek tkanek roślinnych, a kończąc na obrazowaniu fotoluminescencji pól uprawnych z wykorzystaniem zdjęć satelitarnych.

Streszczenie

Fluorescencja chlorofilu *a* jest czułą, nieinwazyjną i szybką metodą pomiaru wydajności fotosystemu II (PSII). Artykuł przedstawia wprowadzenie teoretyczne, historię odkrycia fenomenu, opis najczęściej używanych technik oraz praktyczne zastosowanie pomiarów fluorescencji chlorofilu *a* w badaniach. Scharakteryzowano trzy główne metody pomiaru fluorescencji chlorofilu *a* tj. szybka, modulowana oraz jej obrazowanie. Analiza parametrów fotoluminescencji chlorofilu *a* dostarcza wielu informacji o funkcjonowaniu PSII roślin rosnących w warunkach stresu abiotycznego i biotycznego, jest powszechnie wykorzystywana przez fizjologów roślin oraz ekofizjologów. Przedstawiono najnowsze wyniki badań wpływu wybranych niekorzystnych warunków środowiska (promienowanie świetlne, wysoka temperatura, przeschłodzenie, susza, zalanie, uszkodzenie mechaniczne) na zmiany parametrów fluorescencji chlorofilu *a*. Artykuł jest wprowadzeniem do tematyki pomiarów fluorescencji chlorofilu *a* i jest przeznaczony dla osób zainteresowanych wykorzystaniem jej w swoich badaniach.

LITERATURA

- AL-RAWASHDEH N. A. F., 2012. *Current achievement and future potential of fluorescence spectroscopy*. [W:] *Macro To Nano Spectroscopy*. UDDIN J. (red.). InTech, Croatia, 209-250.
- BAKER N. R., ROSENQVIST E., 2004. *Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities*. *J. Exp. Bot.* 55, 1607-1621.
- BARBAGALLO R. P., OXBOROUGH K., PALLET K. E., BAKER N. R., 2003. *Rapid, non-invasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging*. *Plant Physiol.* 132, 485-493.
- BARRON-GAFFORD G. A., RASCHER U., BRONSTEIN J. L., DAVIDOWITZ G., CHASZAR B., HUXMAN T. E., 2012. *Herbivory of wild Manduca sexta causes fast down-regulation of photosynthetic efficiency in Datura wrightii: an early signaling cascade visualized by chlorophyll fluorescence*. *Photosynth. Res.* 113, 249-260.
- BERTOLDE F. Z., ALMEIDA A. A., PIROVANI C. P., GOMES F. P., AHNERT D., BALIGAR, V. C., VALLE, R. R., 2012. *Physiological and biochemical responses of Theobroma cacao L. genotypes to flooding*. *Photosynthetica* 50, 447-457.
- BILGER W., BJÖRKMAN O., 1990. *Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.* 25, 173-185.
- BJÖRKMAN O., DEMMIG B., 1987. *Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins*, *Planta* 170, 489-504.
- BLANKENSHIP R. E., 2014. *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. Blackwell Science, Oxford.
- BUSCHMANN C., LICHTENTHALER H. K., 1998. *Principles and characteristics of multicolour fluorescence imaging of plants*. *J. Plant Physiol.* 152, 297-314.
- BUSCHMANN C., LANGSDORF G., LICHTENTHALER H. K., 2000. *Imaging of the blue, green and red fluorescence emission of plants: An overview*. *Photosynthetica* 38, 483-491.
- BUSCHMANN C., LANGSDORF G., LICHTENTHALER, H. K., 2009. *The blue, green, red and far-red fluorescence signatures of plant tissues, their multicolor fluorescence imaging and application for agrofood assessment*. [W:] *Optical Methods for Monitoring Fresh and Processed Food-Basics and Applications for a Better Understanding of Non-Destructive Sensing*. ZUDE M. (red.). Taylor&Francis Group, CRC Press, Boca Raton, 272-319.
- CHAERLE L., VAN DER STRAETEN D., 2001. *Seeing is believing: imaging techniques to monitor plant health*. *Biochim. Biophys. Acta* 1519, 153-166.
- COSTA A. C., REZENDE-SILVA S. L., MEGGUER C. A., MOURA L. M. F., ROSA M., SILVA A. A., 2015. *The effect of irradiance and water restriction on photosynthesis in young jatobá-do-cerrado (Hymenaea stigonocarpa) plants*. *Photosynthetica* 53, 118-127.
- DAI F., ZHOU M., ZHANG G., 2007. *The change of chlorophyll fluorescence parameters in winter barley during recovery after freezing shock and as affected by cold acclimation and irradiance*. *Plant Physiol. Bioch.* 45, 915-921.
- DROŻAK A., ROMANOWSKA E., 2006. *Acclimation of mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize to different irradiances during growth*. *BBA Bioenerg.* 1757, 1539-1546.

- DUYSENS L. N. M., SWEERS H. E., 1963. *Mechanism of the two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence*. [W:] *Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria*. JAPANESE SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS (red.). University of Tokyo Press, Tokyo, 353-372.
- FARALONI C., CUTINO I., PETRUCCCELLI R., LEVA A. R., LAZZERI S., TORZILLO G., 2011. *Chlorophyll fluorescence technique as a rapid tool for in vitro screening of olive cultivars (Olea europaea L.) tolerant to drought stress*. *Environ. Exp. Bot.* 73, 49-56.
- FRYER M. J., ANDREWS J. R., OXBOROUGH K., BLOWERS D. A., BAKER N. R., 1998. *Relationship between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport, and active O₂ metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature*. *Plant Physiol.* 116, 571-580.
- GENTY B., BRIANTAIS J. M., BAKER N. R., 1989. *The relationship in situ between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence*. *Biochim. Biophys. Acta* 990, 87-92.
- GHTELSON A. A., BUSCHMANN C., LICHTENTHALER H. K., 1998. *Leaf chlorophyll fluorescence corrected for re-absorption by means of absorption and reflectance measurements*. *J. Plant. Physiol.* 152, 283-296.
- GORBE E., CALATAYUD A., 2012. *Applications of chlorophyll fluorescence imaging technique in horticultural research: A review*. *Sci. Horticult.-Amsterdam* 138, 24-35.
- GOVINDJEE, 1995. *Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll a fluorescence*. *Aust. J. Plant. Physiol.* 22, 131-160.
- GOVINDJEE, 2004. *Chlorophyll a fluorescence: a bit of basics and history*. [W:] *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration*. PAPAGEORGIOU G. C., GOVINDJEE (red.). Springer, Dordrecht, 1-42.
- HAQUE M. S., KJAER K. H., ROSENQVIST E., SHARMA D. K., OTTOSEN C. O., 2014. *Heat stress and recovery of photosystem II efficiency in wheat (Triticum aestivum L.) cultivars acclimated to different growth temperatures*. *Environ. Exp. Bot.*, 99, 1-8.
- HOLT N. E., ZIGMANTAS D., VALKUNAS L., LI X. P., NIYOGI K. K., FLEMING G. R., 2005. *Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting*. *Science* 307, 433-436.
- JABŁOŃSKI A., 1933. *Efficiency of anti-stokes fluorescence in dyes*. *Nature* 131, 839-840.
- JOINER J., YOSHIDA Y., VASILKOV A. P., MIDDLETON E. M., 2011. *First observations of global and seasonal terrestrial chlorophyll fluorescence from space*. *Biogeosciences* 8, 637-651.
- JOLIOT P., JOLIOT A., 2003. *Excitation transfer between photosynthetic units: the 1964 experiment*. *Photosynth. Res.* 76, 241-245.
- KACPERSKA A., 2012. *Reakcje roślin na stresowe czynniki środowiska*. [W:] *Fizjologia roślin*. KOPCEWICZ J., LEWAK S. (red.). PWN, Warszawa, 634-708.
- KALAJI M. H., 2011. *Oddziaływanie abiotycznych czynników stresowych na fluorescencję chlorofilu w roślinach wybranych odmian jęczmienia Hordeum vulgare L.* Wydawnictwo SGGW, Warszawa.
- KAUTSKY H., HIRSCH A., 1931. *Neue Versuche zur Kohlensäure-assimilation*. *Naturwissenschaften* 19, 964.
- KEREN N., BERG A., VAN KAN P. J. M., LEVANON H., OHAD I., 1997. *Mechanism of photosystem II photoinactivation and D1 protein degradation at low light: the role of back electron flow*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 1579-1584.
- KISS A. Z., RUBAN A. V., HORTON P., 2008. *The PsbS protein controls the organization of the photosystem II antenna in higher plant thylakoid membranes*. *J. Biol. Chem.* 283, 3972-3978.
- KOURIL R., ZYGADLO A., ARTENI A. A., DE WIT C. D., DEKKER J. P., JENSEN P. E., SCHELLER H. V., BOEKEMA E. J., 2005. *Structural characterization of a complex of photosystem I and light-harvesting complex II of Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry* 44, 10935-10940.
- KRASNOVSKY JR A. A., 2003. *Chlorophyll isolation, structure and function: major landmarks of the early history of research in the Russian Empire and the Soviet Union*. *Photosynth. Res.* 76, 389-403.
- LARRÉ C. F., FERNANDO J. A., MARINI P., BACARIN M. A., PETERS, J. A., 2013. *Growth and chlorophyll a fluorescence in Erythrina crista-galli L. plants under flooding conditions*. *Acta Physiol. Plant.* 35, 1463-1471.
- LI W. D., HU X., LIU J. K., JIANG G. M., LI O., XING D., 2011. *Chromosome doubling can increase heat tolerance in Lonicera japonica as indicated by chlorophyll fluorescence imaging*. *Biol. Plantarum*, 55, 279-284.
- LI X., CAI J., LIU F., ZHOU Q., DAI T., CAO W., JIANG D., 2015. *Wheat plants exposed to winter warming are more susceptible to low temperature stress in the spring*. *Plant. Growth. Regul.* 1-9. DOI 10.1007/s10725-015-0029-y
- MAXWELL K., JOHNSON G. N., 2000. *Chlorophyll fluorescence-a practical guide*. *J. Exp. Bot.* 51, 659-668.
- MISHRA K. B., IANNAcone R., PETROZZA A., MISHRA A., ARMENTANO N., LA VECCHIA G., TRTILEK M., CELLINI F., NEDBAL L., 2012. *Engineered drought tolerance in tomato plants is reflected in chlorophyll fluorescence emission*. *Plant Sci.* 182, 79-86.
- NISHIYAMA Y., ALLAKHVERDIEV S. I., MURATA N., 2006. *A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II*. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 742-749.
- NISHIYAMA Y., MURATA N., 2014. *Revised scheme for the mechanism of photoinhibition and its application to enhance the abiotic stress tolerance of the photosynthetic machinery*. *Appl. Microbiol. Biot.* 98, 8777-8796.
- PAILLOTIN G., 1976. *Movement of excitations in the photosynthetic domains of photosystem II*. *J. Theor. Biol.* 58, 237-252.
- PAPAGEORGIOU G., 1975. *Chlorophyll fluorescence an intrinsic probe at photosynthesis*. [W:] *Bioenergetics of photosynthesis*. GOVINDJEE (red.). Academic Press, NewYork, 319-371.
- PAPAGEORGIOU G. C., GOVINDJEE, 2011. *Photosystem II fluorescence: slow changes - scaling from the past*. *J. Photochem. Photobiol. B.* 104, 258-270.
- PFÜNDEL E. E., KLUGHAMMER C., MEISTER A., CEROVIC Z. G., 2013. *Deriving fluorometer-specific values of relative PSI fluorescence intensity from quenching of F0 fluorescence in leaves of Arabidopsis thaliana and Zea mays*. *Photosynth. Res.* 114, 189-206.
- QUILLIAM R. S., SWARBRICK P. J., SCHOLES J. D., ROLFE S. A., 2006. *Imaging photosynthesis in wounded leaves of Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 57, 55-69.

- RAPACZ M., 2007. *Chlorophyll a fluorescence transient during freezing and recovery in winter wheat*. *Photosynthetica* 45, 409-418.
- ROSENQVIST E., VAN KOOTEN O., 2003. *Chlorophyll fluorescence: a general description and nomenclature*. [W:] *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology* DEELL J. R., TIOVONEN P. M. A. (red.). Kluwer Academic Publishers, Boston, 31-77.
- RÖTTGERS R., 2007. *Comparison of different variable chlorophyll a fluorescence techniques to determine photosynthetic parameters of natural phytoplankton*. *Deep-Sea Res. Pt. I* 54, 437-451.
- SCHANSKER G., YUAN Y., STRASSER R. J., 2008. *Chl a fluorescence and 820 nm transmission changes occurring during a dark-to-light transition in pine needles and pea leaves: a comparison*. [W:] *Energy from the Sun*. ALLEN J. F., OSMOND B., GOLBECK J. H., GANTT E. (red.). Springer, Dordrecht, 945-949.
- SCHREIBER U., 2004. *Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview*. [W:] *Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis* PAPAGEORGIOU G. C., GOVINDJEE (red.). Kluwer, Dordrecht, 279-319.
- SCHREIBER U., SCHLIWA W., BILGER U., 1986. *Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorimeter*. *Photosynth. Res.* 10, 51-62.
- SRIVASTAVA A., STRASSER R. J., 1997. *Constructive and destructive actions of light on the photosynthetic apparatus*. *J. Sci. Ind. Res.* 56, 133-148.
- STARCK Z., 2014. *Fizjologia roślin: jak było wczoraj, jak jest dziś, a co przyniesie jutro?* *Kosmos* 63, 569-589.
- STIRBET A., GOVINDJEE, 2011. *On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient*. *J. Photochem. Photobiol. B.* 104, 236-257.
- STIRBET A., SRIVASTAVA A., STRASSER R. J., 1998. *The energetic connectivity of PSII centres in higher plants probed in vivo by the fast fluorescence rise O-J-I-P and numerical simulations*. [W:] *Photosynthesis: Mechanisms and Effects, Proceedings of the Xlth International Congress on Photosynthesis. Budapest, Hungary*. GARAB G. (red.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 4317-4320.
- STOKES G. G., 1852. *On the change of refrangibility of light*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 142, 463-562.
- STRASSER R. J., 1978 *The grouping model of plant photosynthesis*. [W:] *Chloroplast Development*. AKOYUNOGLU G., ARGYROUDI-AKOYUNOGLU J. H. (red.) Elsevier Biomedical, 513-538.
- STRASSER R. J., GOVINDJEE, 1991. *The F_0 and the OJIP fluorescence rise in higher plants and algae*. [W:] *Regulation of Chloroplast Biogenesis*, ARGYROUDI-AKOYUNOGLU J. H. (red.). Plenum Press, New York, 423-426.
- STRASSER B. J., STRASSER R. J., 1995. *Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP test*. [W:] *Photosynthesis: From Light to Biosphere*. MATHIS P. (red.). Kluwer Academic, The Netherlands, 977-980.
- STRASSER R. J., SRIVASTAVA A., TSIMILLI-MICHAEL M., 2000. *The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples*. [W:] *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation*. YUNUS M., PATHRE U., MOHANTY P. (red.). Taylor and Francis, London, 443-480.
- STRASSER R. J., TSIMILLI-MICHAEL M., SRIVASTAVA A., 2004. *Analysis of the chlorophyll fluorescence transient*. [W:] *Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration*. PAPAGEORGIOU G. C., GOVINDJEE (red.), Springer, Dordrecht, Holland, 321-362.
- STRASSER R. J., TSIMILLI-MICHAEL M., QIANG S., GOLTSEV V., 2010. *Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis**. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 1313-1326.
- STRZAŁKA K., 2012. *Fotosynteza i chemosynteza*. [W:] *Fizjologia roślin*. KOPCEWICZ J., LEWAK S. (red.). PWN, Warszawa, 274-444.
- SULKIEWICZ M., CIERESZKO I., 2014. *Odpowiedź *Triticum aestivum* L. na zranienie mechaniczne*. [W:] *Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosystemu. Zagrożenia środowiska a ochrona gatunkowa roślin i grzybów*. ŁASKA G. (red.). Polskie Towarzystwo Botaniczne, Białystok, 263-273.
- TÓTH S. Z., SCHANSKER G., STRASSER R. J., 2007. *A non-invasive assay of the plastoquinone pool redox state based on the OJIP-transient*. *Photosynth. Res.* 93, 193-203.
- TSIMILLI-MICHAEL M., PECHEUX M., STRASSER R. J., 1998. *Vitality and stress adaptation of the symbionts of coral reef and temperate foraminifers probed in hospite by the fluorescence kinetics OJIP*. *Archs. Sci. Geneve* 51, 205-240.
- WANG X., DINLER B. S., VIGNJEVIC M., JACOBSEN S., WOLLENWEBER B., 2015. *Physiological and proteome studies of responses to heat stress during grain filling in contrasting wheat cultivars*. *Plant Sci.* 230, 33-50.
- YU B., ZHAO C. Y., LI J., LI J. Y., PENG G., 2015. *Morphological, physiological, and biochemical responses of *Populus euphratica* to soil flooding*. *Photosynthetica* 53, 110-117.
- ZHAO M., YU K., 2014. *Application of chlorophyll fluorescence technique in the study of coral symbiotic zooxanthellae micro-ecology*. *Acta Ecol. Sin.* 34, 165-169.

KOSMOS Vol. 65, 1, 103–115, 2016

CHLOROPHYLL A FLUORESCENCE – HISTORY OF DISCOVERY AND PRACTICAL APPLICATION IN ENVIRONMENTAL PLANT SCIENCE

MICHAŁ SULKIEWICZ, IWONA CIERESZKO

*University of Białystok, Faculty of Biology and Chemistry, Institute of Biology, Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok,
e-mail: m.sulkiewicz@uwb.edu.pl*

Summary

Chlorophyll *a* fluorescence is a sensitive, non-invasive fast tool for measuring photosynthetic efficiency mainly of photosystem II (PSII). We present description of basic photoluminescence mechanism, history of chlorophyll fluorescence discovery and review of main chlorophyll fluorescence measurement techniques with practical issue. In this article, we focus on methods of a fast chlorophyll fluorescence, pulse-amplitude modulated chlorophyll fluorescence and chlorophyll fluorescence imaging technique. Described techniques are powerful and widely use tools, available for plant physiologists and ecophysiologicalists. Analysis of the chlorophyll fluorescence parameters, which are good indicators or biomarkers of plant tolerance, provides many information about efficiency of PSII during abiotic and biotic stress. We describe how environmental stress conditions (irradiance, heat, cold, drought, flood and mechanical wounding) influence to most popular chlorophyll *a* fluorescence parameters and how to interpret them. The aim of this review is to provide a simple, practical guide to chlorophyll fluorescence for beginners.