

ASPECTE PRIVIND UTILIZAREA FLUORESCENȚEI CLOROFILEI ÎN STUDIAREA INFLUENȚEI FACTORILOR DE MEDIU ASUPRA FOTOSINTEZEI LA MĂR

ASPECTS REGARDING THE USE OF CHLOROPHYLL FLUORESCENCE TO THE STUDY OF THE INFLUENCE OF THE ENVIRONMENTAL FACTORS UPON APPLE TREE PHOTOSYNTHESIS PROCESS

Monica FLEANCU¹, Viorica CHIȚU²

¹Universitatea din Pitești, ²I.C.D.P. Pitești – Mărăcineni

Abstract: Chlorophyll fluorescence analysis has become one of the most powerful and widely used techniques available to plant physiologists and ecophysiologists. Chlorophyll fluorescence gives information about the state of photosystem II. The flow of electrons through PS II is indicative, under many conditions, of the overall rate of photosynthesis. It gives us the potential to estimate photosynthetic performance, under condition in which other methods would fail, in a manner that is almost instantaneous.

Fluorescența clorofilei este relativ o nouă tehnologie care a fost utilizată în determinările în câmp. Din punct de vedere fiziologic, aceasta măsoară eficiența luminii la nivelul fotosistemului II. Fluorescența poate fi determinată rapid, în aproximativ 30 secunde, fiind o metodă nedistructivă, permițând repetarea determinării la aceeași frunză. În vivo, modificările fluorescenței clorofilei privesc exclusiv clorofila a localizată în fotosistemul II (incluzând și antena sa). Astfel, fluorescența clorofilei in vivo poate oferi imediat informații cu privire la folosirea și disiparea energiei în cadrul FS II. De-a lungul ultimilor ani, numeroși cercetători au publicat articole referitoare la această problemă, analizând relația dintre fluorescența clorofilei și eficiența fotosistemului II la diferite plante. Cele mai importante motive al popularității acestei metode constau, pe lângă ușurința și siguranța ei, în faptul că instrumentul este portabil, compact, fotosinteza plantelor putând fi analizată în mediul natural.

MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Experimentele s-au realizat la soiurile de măr Jonathan, Golden delicious și Idared, în cadrul plantației din cadrul Institutului de Cercetare - Dezvoltare pentru Pomicultură Mărăcineni. S-au determinat, la nivelul frunzelor și fructelor, cu ajutorul fluorometruului OS-30 (Opti-Sciences) următorii indicatori:

- Fo, fluorescența minimă, apare în condițiile în care antenele colectoare sunt deschise pentru primirea cuantelor de lumină, frunza fiind adaptată la întuneric (cel puțin 15 minute);
- Fm, fluorescența maximă înregistrată după expunerea la sursa de excitație (spotul luminos al fluorimetruului). În aceste condiții toate situsurile antenelor colectoare sunt închise, saturate cu cuante de lumină;
- Ft – fluorescența determinată în câmp (momentană);

- F_v/F_m reprezintă raportul variației fluorescenței până la fluorescența maximă. Variația fluorescenței reprezintă modificarea intensității acesteia între nivelele F_0 și F_m . Este un indicator al eficienței maxime la transferului energiei de excitație și se calculează cu ajutorul formulei: $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$;
- $(F_m - F_t)/F_m$ reprezintă eficiența fotosistemului II în condiții de iluminare. Acest raport are valori scăzute, comparativ cu valorile eficienței FS II (F_v/F_m) în condiții de adaptare la întuneric. Aceasta se datorează faptului că centrul de reacție al FS II sunt parțial închis și faptului că este stimulată disiparea nonradiativă.

Determinările de fluorescență s-au efectuat în dinamică sezonieră. Deasemeni, s-au înregistrat valori ale fluorescenței la nivelul frunzelor și fructelor în cazul celor trei soiuri de măr menționate. Datele despre fluorescență au fost corelate cu cele intensitatea luminii, umiditatea relativă a aerului și cu temperatura aerului. Acești parametri au fost înregistrați cu ajutorul luxmetrului, psihrometrului și termometrului. Rezultatele au fost interpretate statistic cu ajutorul programului SPSS 10,0 for Windows, folosind testul Games – Howell pentru analiza varianței, iar pentru stabilirea influenței factorilor de mediu asupra fluorescenței clorofilei s-au aplicat corelațiile simple și parțiale.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În figura 1 (A) sunt reprezentate grafic rezultatele obținute în urma calculării eficienței fotosintetice a FS II în condiții de iluminare. Rezultatele sunt prezentate în dinamică sezonieră, între lunile aprilie – august. Se constată că, în cazul soiului de măr Idared, în luna aprilie, valorile $(F_v - F_m)/F_m$ au fost superioare celor înregistrate pentru soiurile Golden delicious și Jonathan.

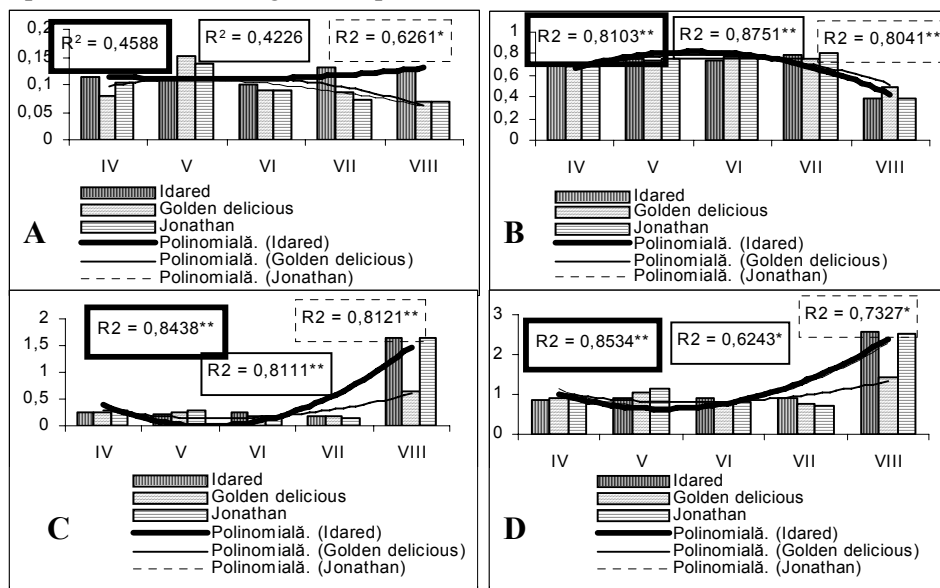


Figura 1. Dinamica sezonieră a fluorescenței clorofilei: $[(f_v - f_m)/f_m]$ (A); (f_v/f_m) (B); (f_0) (C); (f_m) (D) (*. Corelația este semnificativă pentru $p < 0,05$; **. Corelația este semnificativă pentru $p < 0,01$)

Eficiența fotosistemului II a avut valori maxime în lunile iulie și august, și, în general, în perioada de timp analizată valorile $(F_v - F_m)/F_m$ s-au situat între 0,10 și 0,13. În ceea ce privește soiul de măr Golden delicious, $(F_v - F_m)/F_m$ a avut valori maxime în luna mai (0,15), pentru ca în luna august să se înregistreze cea mai mică valoare a eficienței FS II (0,07). În cazul soiului de măr Jonathan, prin calcularea coeficientului de determinare $R^2 = 0,6261$ s-a arătat existența unei corelații semnificative a valorilor $(F_v - F_m)/F_m$ cu perioada de determinare, pentru pragul $p < 0,05$. Cea mai mare valoare a $(F_v - F_m)/F_m$ s-a înregistrat în cazul soiului Jonathan în luna mai.

În figura 1 (B) sunt reprezentate grafic rezultatele obținute în urma determinării eficienței fotosistemului II în condiții de adaptare la întuneric (F_v/F_m). Pentru toate cele trei soiuri de măr studiate, calcularea coeficienților de determinare a demonstrat existența unei corelații semnificative a valorilor cu momentul de determinare, pentru un prag de semnificație de $p < 0,01$. În figura 1 (C) sunt reprezentate valorile fluorescenței minime (F_0) în dinamică sezonieră. Se constată, începând cu luna aprilie, valori scăzute ale acestui parametru pentru cele trei soiuri de măr, cuprinse între 0,24 și 0,28. Valorile scăzute se mențin și în lunile următoare, pentru ca în luna august acestea să crească, ajungând la 0,65 – 1,65. Valorile fluorescenței maxime la soiurile de măr Idared, Golden delicious și Jonathan sunt determinate în dinamică sezonieră și reprezentate grafic în figura 1 (D). În luna aprilie s-au înregistrat valori de 0,87 pentru Idared, 0,93 pentru Golden și 0,89 pentru Jonathan. În lunile următoare valorile se mențin în jurul aceluiași interval, pentru ca în luna august acestea să crească, fiind de 2,59 la Idared, 1,44 la Golden și 2,54 la Jonathan. Valorile coeficienților de determinare arată o corelație semnificativă între fluorescența maximă și momentul determinării, fie pentru un prag de semnificație de $p < 0,01$ (în cazul soiului de măr Idared), fie de $p < 0,05$ (în cazul soiurilor de măr Golden și Jonathan).

În figura 2 este reprezentată grafic dinamica fluorescenței momentane a clorofilei (F_t) în cazul soiurilor de măr studiate. Pentru soiul Idared, valorile F_t se încadrează între 0,78 și 0,84 în lunile aprilie – iulie, pentru ca în luna august să ajungă la 2,23. Coeficientul de determinare $R^2 = 0,8439$ arată o corelație semnificativă a valorilor cu momentul de determinare. O dinamică sezonieră asemănătoare se observă și în cazul soiurilor de măr Golden delicious și Jonathan.

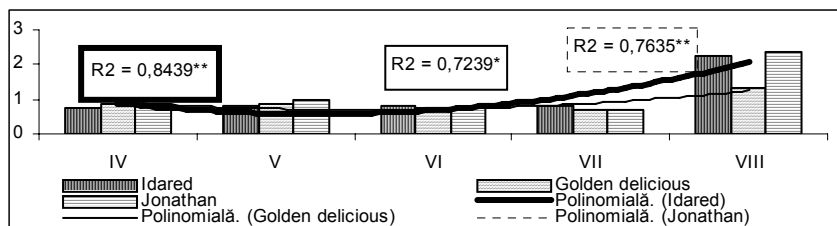


Figura 2. Dinamica sezonieră a fluorescenței clorofilei (f_t) (**. Corelația este semnificativă pentru $p < 0,01$; *. Corelația este semnificativă pentru $p < 0,05$)

Fluorescența clorofilei a fost determinată și la nivelul fructelor, în lunile iunie, iulie și august. În cazul parametrului ce exprimă eficiența fotosistemului II în condiții de iluminare - $(F_m - F_m)/F_m$ – (figura 3, A) se observă o creștere a valorii în luna iulie la soiurile Idared și Golden delicious față de luna iunie, urmată apoi de nouă scădere a valorilor în luna august. În cazul soiului Jonathan, cea mai mare valoare a eficienței fotosistemului II la lumină s-a determinat în luna iunie, valorile lunilor iulie și august situându-se în scădere. În cazul soiului de măr Jonathan calcularea coeficientului de determinare a arătat existența unei corelații negative semnificative cu momentul de determinare, eficiența fotosistemului II în condiții de iluminare scăzând din luna iunie spre luna august.

În figura 3, B sunt reprezentate grafic rezultatele obținute în urma determinării eficienței maxime a fotosistemului II în urma adaptării la întuneric. Pentru cele trei soiuri rezultatele sunt în scădere în luna august față de lunile iunie și iulie, în mod semnificativ în cazul soiurilor de măr Idared și Jonathan (pentru un prag de semnificație $p < 0,001$, respectiv $p < 0,05$).

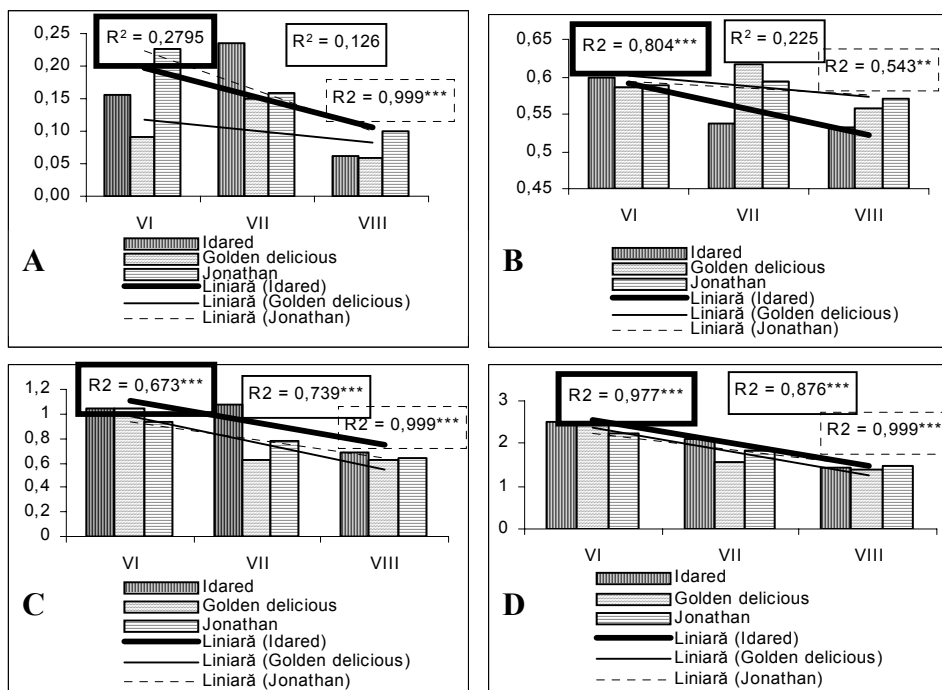


Figura 3. Dinamica sezonieră a fluorescenței clorofilei: $[(f_m - f_v)/f_m]$ (A), (f_v/f_m) (B), f_0 (C), (f_m) (D) determinată la nivelul fructelor (***. Corelația este semnificativă pentru $p < 0,001$; **. Corelația este semnificativă pentru $p < 0,01$)

Fluorescența minimă a clorofilei (f_0) a prezentat valori cuprinse între 0,93 și 1,05 în luna iunie la cele trei soiuri de măr; aceste valori au scăzut în luna iulie la 0,62 în cazul soiului Golden delicious și la 0,78 în cazul soiului Jonathan. În luna august s-au înregistrat în continuare scăderi ale parametrului f_0 , corelațiile fiind semnificative pentru pragul de $p < 0,001$ (figura 3, C). Parametrul f_m ce reprezintă fluorescența momentană a clorofilei prezintă în lunile iunie – august o evoluție similară cu ceilalți parametri ai fluorescenței clorofilei; se înregistrează o scădere a valorilor o dată cu procesul de maturare a fructelor, coeficienții de determinare având valori semnificative pentru $p < 0,001$ (figura 3, D).

De asemenea, în figura 4 sunt prezentate variațiile parametrului f_t și se constată scăderea valorilor în luna august, comparativ cu lunile iunie și iulie.

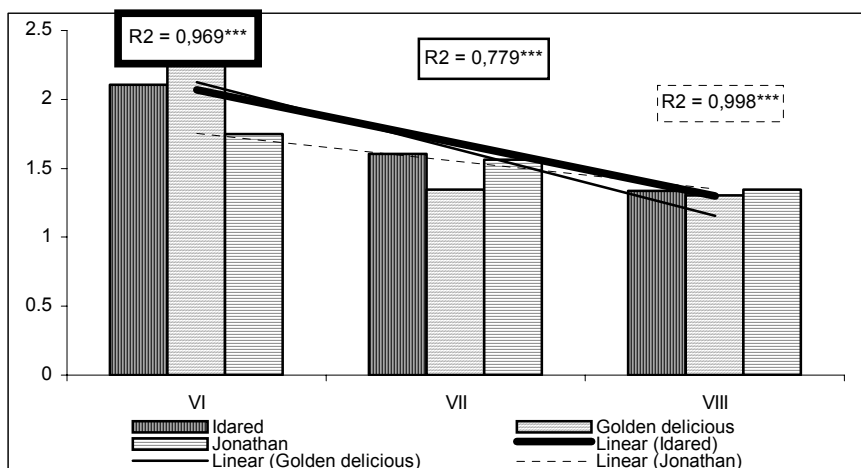


Figura 4. Dinamica sezonieră a fluorescenței clorofilei (f_t) determinată la nivelul fructelor (***. Corelația este semnificativă pentru $p < 0,001$)

Pentru stabilirea dependenței parametrilor fluorescenței clorofilei în funcție de principalii factori de mediu care influențează fotosinteza s-au efectuat determinări în lunile iunie, iulie și august, cuprinzând doar anumite intervale de variație ale acestor factori. Astfel, s-a urmărit variația parametrilor fluorescenței clorofilei în funcție de intensitatea luminii cuprinsă între 850 lucși și 15 000 lucși; în funcție de umiditatea atmosferei cuprinsă între 63% și 80%; în funcție de temperatura aerului cuprinsă între 13°C și 25°C. În momentul fiecărei determinări s-au determinat intensitatea luminii cu ajutorul luxmetrului, umiditatea aerului cu ajutorul psihrometrului și temperatura aerului cu ajutorul termometrului.

În tabelul 1 sunt prezentate rezultatele obținute în urma calculării coeficienților de corelație simplă între eficiența fotosistemului II în condiții de iluminare și factorii de mediu. Se constată existența unor corelații semnificative pozitive între acest parametru și intensitatea luminii și umiditatea aerului; corelația cu temperatura aerului este negativă semnificativă. În toate cazurile, pragul de semnificație este de $p < 0,05$.

Tabelul 1.

**Calcularea corelațiilor simple între fluorescența clorofilei [(fm-ft)/fm]
determinată la nivelul frunzelor și factorii de mediu**

		(fm-ft)/fm
Intensitatea luminii	Coeficientul de corelație	0,149**
	Pragul de semnificație	0,005
	Numărul de determinări	354
Umiditatea aerului	Coeficientul de corelație parțială	0,159**
	Pragul de semnificație	0,003
	Numărul de determinări	354
Temperatura aerului	Coeficientul de corelație parțială	-0,149**
	Pragul de semnificație	0,005
	Numărul de determinări	354

** . Corelația este semnificativă pentru $p < 0,01$.

Calcularea corelațiilor parțiale a permis izolarea influenței a doi dintre factorii de mediu, urmărindu-se numai influența unuia dintre aceștia (tabelul 2). Astfel, (fm-ft)/fm se corelează cu intensitatea luminii în mod pozitiv semnificativ; o dată cu creșterea intensității luminii între 850 lucși și 15 000 lucși are loc creșterea eficienței fotosistemului II. Acesta poate „pompa” electroni, aceștia provenind de la nivelul centrilor de reacție ai FS II, care sunt deschiși.

Tabelul 2

**Calcularea corelațiilor parțiale între fluorescența clorofilei [(fm-ft/fm)]
determinată la nivelul frunzelor și factorii de mediu**

	Factorii considerați constanți		(fm-ft)/fm
Intensitatea luminii	Umiditatea aerului	Coeficientul de corelație parțială	0,166**
	Temperatura aerului	Pragul de semnificație	0,002
		Numărul de determinări	350
Umiditatea aerului	Intensitatea luminii	Coeficientul de corelație parțială	0,046
	Temperatura aerului	Pragul de semnificație	0,384
		Numărul de determinări	350
Temperatura aerului	Umiditatea aerului	Coeficientul de corelație parțială	0,020
	Intensitatea luminii	Pragul de semnificație	0,705
		Numărul de determinări	350

**. Corelația este semnificativă pentru $p < 0,01$.

Când rata de absorbție a luminii depășește capacitatea reacțiilor de întuneric, electronii se acumulează la nivelul acceptorului situat lângă FS II. Aceasta are ca rezultat descreșterea eficienței FS II, și, eventual, transportul de electroni va ajunge la saturare. În cazul intensității mari a luminii și a prelungirii perioadei de iluminare puternică această eficiență poate descrește, fenomen caracteristic fotoinhibiției. Umiditatea aerului și temperatura aerului nu au influențat în mod semnificativ acest parametrul al fluorescenței clorofilei, în limitele luate în studiu.

CONCLUZII

1. Eficiența maximă a fotosistemului II adaptat la întuneric are valori maxime în luna iulie în cazul celor trei soiuri de măr studiate, Idared, Golden delicious și Jonathan.

2. Toți parametrii fluorescenței clorofilei determinați la nivelul fructelor prezintă valori în scădere o dată cu procesul de maturare. În comparație cu eficiența maximă a fotosistemului II determinată la nivelul frunzelor, la nivelul fructelor aceasta a înregistrat valori mai mici, diferențele fiind semnificative din punct de vedere statistic.

3. Parametrul (fm-ft)/fm se corelează cu intensitatea luminii în mod pozitiv semnificativ; o dată cu creșterea intensității luminii între 850 lucși și 15 000 lucși are loc creșterea eficienței fotosistemului II. Acesta poate

„pompa” electroni, aceștia provenind de la nivelul centrilor de reacție ai FS II, care sunt deschiși. Când rata de absorbție a luminii depășește capacitatea reacțiilor de întuneric, electronii se acumulează la nivelul acceptorului situat lângă FS II. Aceasta are ca rezultat descreșterea eficienței FS II, și, eventual, transportul de electroni va ajunge la saturare. În cazul intensității mari a luminii și a prelungirii perioadei de iluminare puternică această eficiență poate descrește, fenomen caracteristic fotoinhibiției.

BIBLIOGRAFIE

1. Colom M.R., Pini Prato E., Giannini R., 2002, - *Chlorophyll fluorescence and photosynthetic response to light in 1-year-old needles during spring and early summer.*- Trees (17).- P- 207-210.
2. Ilik P., Vystrcilova M., Naus J., Kalina J., 1997, - *Chlorophyll fluorescence temperature curves of spruce needles from different whorls of the tree.*- Photosynthetica, 34 (3).- P. 477-480.
3. Maxwell K., Johnson G., 2000, - *Chlorophyll fluorescence – a practical guide.*- Journal of experimental Botany, vol. 51, No. 345.- P. 659-668.
4. Peterson J.A., Groninger J.R., Seiler J.R., Mou P., 1986, - *Utility and limitations of chlorophyll fluorescence for the determination of growth limitation in trees.*- Plant Physiology 81.- P. 423-429.
5. Schreiber U., 1997, - *Chlorophyll fluorescence and photosynthetic energy conversion: Simple introductory experiments with the Teaching-Pam chlorophyll fluorometer.*- Heinz Walz GmbH, Germany.- P. 1-68.
6. Wang K.Y., Kellomaki S., Zha T., 2003, - *Modifications in photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence in 20-year-old pine trees after a four-year exposure to carbon dioxide and temperature elevation.*- Photosynthetica 41 (2).- P. 167-175.