

LUMINESCENCJA W PROCESIE FOTOSYNTETY

A. Brzóstowicz

Zakład Fizyki AR, ul. Papieża Pawła VI nr 3, 71-459 Szczecin

e-mail: fizyka@dedal.man.szczecin.pl

Streszczenie: W pracy scharakteryzowano początkowe reakcje fotosyntezy i towarzyszące jej różne rodzaje luminescencji.

Słowa kluczowe: luminescencja, fotosynteza.

FOTOSYNTETA

Proces fotosyntezy w roślinach polega na wytwarzaniu związków organicznych i wydzielaniu tlenu z dwutlenku węgla i wody przy udziale energii absorbowanego promieniowania tzw. PAR (Photosynthetic Active Radiation).

Fotosynteza zachodzi w błonach tylakoidów zlokalizowanych w chloroplastach (Rys.1). W błonie tylakoidów wbudowany jest aparat fotosyntetyczny składający się z szeregu przenośników elektronów zawierających kompleksy białkowo-barwnikowe [8,19,38,45]. Zasadnicze elementy aparatu fotosyntetycznego to kompleks fotosystemu II (PS II) i kompleks fotosystemu I (PS I). Pomiedzy nimi występują: pula plastochinonu (PQ), cytochromy b/f(CYT_{b/f}) i plastocyanina (PC). W błonie występuje także kanał dla jonów wodorowych (H⁺), tzw. czynnik sprzęgający (CF₀ - CF₁).

Fotosyntetycznie aktywne promieniowanie absorbowane jest przez barwniki obu fotosystemów (chlorofil a, chlorofil b, β-karoten) tworzących tzw. „kompleksy zbierające światło”. Zaabsorbowane promieniowanie powoduje fotolizę wody oraz uruchamia transport elektronowy i przenoszenie protonów przez błony tylakoidów. Transport elektronów i protonów umożliwia w rezultacie

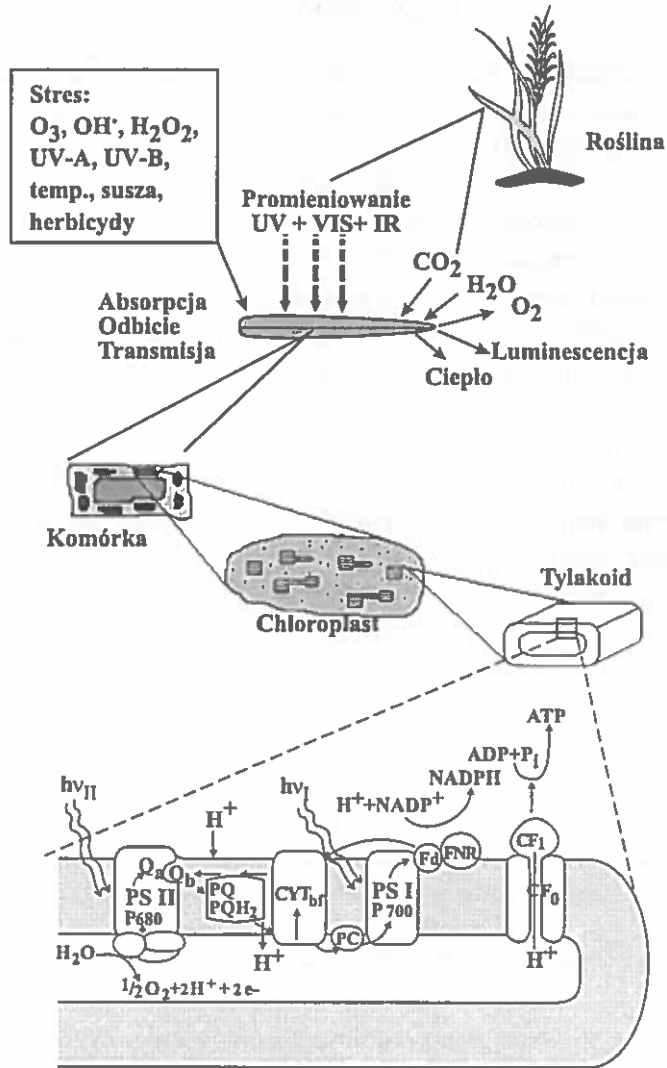
powstanie wysokoenergetycznych związków (ATP i NADPH) niezbędnych w biochemicznych stadiach fotosyntezy. Przenoszenie elektronów z wody do NADP^+ (fosforan dwunukleotydu nikotynamidoadeninowy) odbywa się poprzez PS II, chinonowe akceptory Q_A i Q_B , plastochinon, cytochromy, plastocyjaninę (PC), fotosystem I i ferredoksynę (Fd). NADP^+ po przyłączeniu elektronu i protonu (H^+) wytwarza związek NADPH, który następnie wchodzi w dalsze reakcje biochemiczne.

Drugi wysokoenergetyczny związek ATP (adenozynotrójfosforan) powstaje w wyniku syntezy ADP (adenozynodwufosforan) i nieorganicznego fosforu (P_i) przy udziale enzymu ATP-azy.

Zgodnie z chemiosmotyczną teorią Mitchella [20] fotosyntetyczny transport elektronów sprzężony jest z transportem jonów wodorowych przez błonę tylakoidów. Ilość jonów H^+ przeniesionych do wnętrza tylakoidu w wyniku cyklicznego utleniania i redukowania plastochinonu jest proporcjonalna do ilości kwantów zaabsorbowanego promieniowania [44].

Z drugiej strony wiadomo, że we wnętrzu tylakoidu dodatkowo powstają jony H^+ w wyniku rozkładu wody. W rezultacie na błonie generowany jest gradient elektrochemicznego potencjału jonów wodoru, jak i różnica potencjału elektrycznego pomiędzy zewnętrzną i wewnętrzną stroną błony tylakoidu. Wytwarzana różnica potencjałów może być „pośrednikiem” w syntezie ATP przy udziale enzymu ATP-azy. Proton H^+ wędruje poprzez kanał ($\text{CF}_0 - \text{CF}_1$) z wnętrza tylakoidu na zewnątrz, a jon hydroksylowy OH^- z obszaru zewnętrznego tylakoidu do jego wnętrza. W rezultacie po obu stronach błony z jonów H^+ i OH^- powstaje woda. Gdy zużycie ATP nieznacznie spadnie i zmniejszy się jego synteza wówczas wzrastające ciśnienie jonów H^+ będzie stopniowo hamować reakcje przenoszenia zarówno elektronów, jak i H^+ . Procesom tym będą więc musiały towarzyszyć zmiany gradientu potencjału elektrycznego na błonach tylakoidów [6, 43].

Wszystkie czynniki modyfikujące właściwości błon tylakoidów muszą wpływać na początkowe (fotofizyczne i fotochemiczne) reakcje fotosyntezy [4,10,14,42]. Nawet częściowa degradacja błon tylakoidów hamuje fotosyntezę. Niekiedy dochodzi do częściowej destrukcji lub całkowitej utraty aktywności PS II i naruszenia równowagi pomiędzy przebiegiem fazy świetlnej i asymilacji CO_2 [1,21].



Rys.1. Schemat przepływu energii w liściach roślin, który jest modyfikowany przez różnorodne naturalne i antropogeniczne czynniki stresowe (objaśnienia w tekście).

Fig.1. Scheme of photon energy flow in plant leaves which is modified by a multitude of natural and anthropogenic stressors.

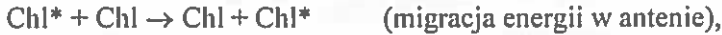
LUMINESCENCJA CHLOROFILU

Kwanty energii promieniowania ($h\nu$) padającego na liść mogą być pochłaniane przez barwniki antenowe (kompleksy zbierające światło), w tym przede wszystkim przez chlorofil (Chl):



Wzbudzona cząsteczka chlorofilu (Chl^*) po czasie około 10^{-9} s może tracić energię różnymi drogami [10, 15, 38]:

1. Przekazuje energię sąsiedniej cząsteczce



2. Wypromieniowuje energię ze stanu wzbudzonego



3. Traci energię bezpromieniście



4. Przeniesienie energii na pułapkowy poziom trypletowy (część energii rozproszona)



Z tego poziomu energia może być zużyta na:

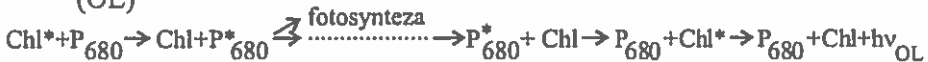
a) ciepło



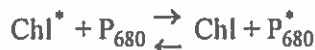
b) ponowne wzbudzenie chlorofilu w wyniku dostarczenia energii z innej cząsteczki



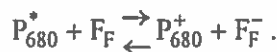
5. Przekazanie energii do reaktywnego centrum PSII i wykorzystanie jej w procesie fotosyntezy lub „powrót” w postaci opóźnionej luminescencji (OL)



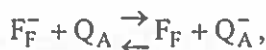
Zagadnienie to wymaga szczegółowego omówienia. Wzbudzona cząsteczka chlorofilu z anteny przekazuje energię do cząsteczki chlorofilu P_{680} w reaktywnym centrum.



W wyniku dostarczonej energii następuje rozdział ładunków pomiędzy cząsteczką chlorofilu P_{680} i cząsteczką feofityny (F_F):



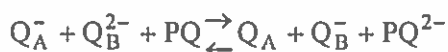
feofityna przekazuje elektron na chinonowy akceptor Q_A :



a następnie możliwe jest przeniesienie elektronu z akceptora Q_A na chinonowy akceptor Q_B :



jeśli w międzyczasie zostaną dostarczone elektrony z systemu rozkładu wody. Dalej elektron może wędrować na plastochinon:



i następnie dalej na kolejne przENOŚniki.

Przedstawione reakcje zachodzące po przekazaniu energii do reaktywnego centrum są odwracalne, choć odwracalność ostatnich czterech reakcji jest kontrowersyjna [9, 10, 42]. Z każdej reakcji w pewnej części występuje rekombinacyjne przenoszenie elektronu („cofnięcie” „powrót”). W rezultacie tego następuje wzbudzenie cząsteczki chlorofilu na drodze chemicznej - ciemnej a energia wzbudzenia zostaje wypromieniowana w postaci tzw. opóźnionej luminescencji. Ze względu na to, że „cofnięcie” elektronów może nastąpić z kilku etapów, to i czas ich „powrotu” i wypromieniowania energii będzie różny. Tak więc po zaprzestaniu wzbudzenia światłem przez kilkadziesiąt sekund można rejestrować zanikające czerwone światło z chlorofilu, czyli opóźnioną luminescencję.

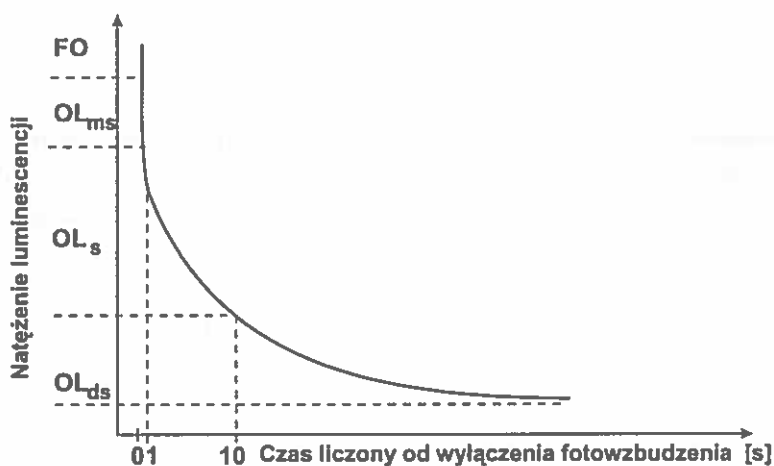
Analizy spektralne zarówno fluorescencji, jak i opóźnionej luminescencji wykazały, że pochodzą one z chlorofilu a fotosystemu II [11,15,19].

Analizując kinetyki zaniku opóźnionej luminescencji można wyróżnić trzy charakterystyczne przedziały czasowe (Rys.2), za które odpowiedzialne są różne składowe luminescencji [10, 42]:

1. Milisekundowa składowa OL (rejestrowana w zakresie milisekund od momentu wyłączenia wzbudzenia).
2. Sekundowa składowa OL (rejestrowana w zakresie sekund od momentu wyłączenia wzbudzenia).
3. Dekasekundowa składowa OL (rejestrowana po czasie dłuższym niż 10s od momentu wyłączenia wzbudzenia).

W literaturze podawane są różne czasy życia jak i ilości składowych [10,15,19,42].

Opóźniona luminescencja aparatu fotosyntetycznego, odkryta w 1951 r. przez Strehlera i Arnolda [37], następuje w wyniku przeniesienia energii ze wzbudzonych stanów metastabilnych i obserwowana jest po wyłączeniu oświetlenia liści, podczas gdy fluorescencja pochodzi ze stanów wzbudzonych powstałych w wyniku pochłonięcia kwantów światła. W literaturze często mylone są te nazwy i zamiast opóźniona luminescencja używa się nazwy opóźniona fluorescencja. Jednakże, jak przedstawiono wyżej, mechanizmy odpowiedzialne za te świecenia są różne.



Rys. 2. Kinetyka zaniku fotoindukowanej luminescencji zielonych liści:

FO - fluorescencja opóźniona; OL_{ms} - opóźniona luminescencja w zakresie milisekundowym; OL_s - opóźniona luminescencja w zakresie sekundowym; OL_{ds} - opóźniona luminescencja w zakresie dekadsekundowym.

Fig. 2. Kinetics of decay of photoluminescence in green leaves:

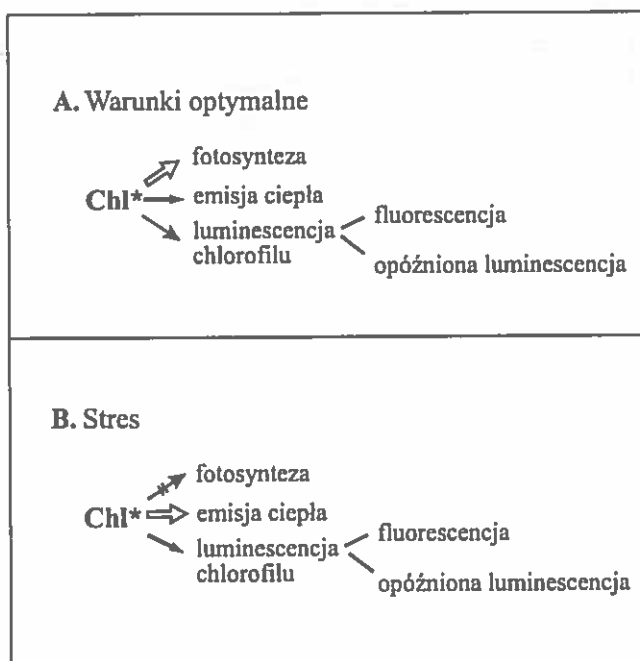
FO - delayed fluorescence; OL_{ms} - delayed luminescence in milliseconds range; OL_s - delayed luminescence in seconds range; OL_{ds} - delayed luminescence in decaseconds range.

Opóźniona luminescencja może być m.in. wskaźnikiem „energizacji” błony tylakoidu, czyli gradientu potencjału. Zaobserwowano bowiem jednoczesny wzrost gradientu potencjału elektrycznego i natężenia OL przy zmianie pH środowiska zawiesiny chloroplastów lub przyłożeniu do niej pola elektrycznego [40, 42].

DETEKCJA STRESU

Warunki stresowe i zniszczenia wywołane stresem w roślinach mogą być wykryte przy użyciu klasycznych ekofizjologicznych metod pomiaru intensywności fotosyntezy, oddychania, przewodnictwa szparkowego, potencjału wody, zawartości fotosyntetycznych barwników lub koncentracji metabolitów po stresie. Większość czynników stresujących, nawet jeśli nie oddziałują bezpośrednio na aparat fotosyntetyczny lub jego funkcje, będzie w końcu oddziaływać na proces fotosyntezy [12, 13, 34, 35, 43, 46].

W fizjologicznie optymalnych warunkach około 80%÷90% zaabsorbowanej energii przez cząsteczki chlorofilu (Chl^*) jest wykorzystywana w procesie fotosyntezy, 5%÷15% rozpraszane w postaci ciepła a 0,5%÷5% stanowi luminescencję (rys.3A) [17].



Rys.3. Schemat przekazania wzbudzenia przez wzbudzony chlorofil a (Chl^*) w warunkach optymalnych (A) i stresowych. (B).

Fig.3. De-excitation of the excited states of chlorophyll a (Chl^*) by photosynthetic quantum conversion under physiological (A) and stress conditions (B).

W stresie przemiana fotosyntetyczna energii maleje, natomiast wzrasta emisja ciepła i luminescencja chlorofilu (rys.3B).

Zmiany wywołane stresem w fotosyntetycznym transporcie elektronowym, jak i uszkodzenia aparatu fotosyntetycznego, mogą być łatwo wykryte przez nieinwazyjne metody pomiaru luminescencji (indukcji fluorescencji lub opóźnionej luminescencji) chlorofilu. Metody te umożliwiają stwierdzić czy dany czynnik stresowy wywołał stres w roślinie zanim pojawią się widoczne nieodwracalne uszkodzenia czy zniszczenia.

Pomiar opóźnionej luminescencji zielonych liści pozwala na uzyskanie informacji o wrażliwości błon tylakoidalnych (w których zlokalizowany jest fotosystem II) i przez to pośrednio o stanie fizjologicznym całej rośliny i jej odporności na stresowe warunki środowiska [23].

Pomiary opóźnionej luminescencji w zakresie milisekundowym wykorzystywano również w badaniach wpływu różnych czynników na rośliny [7,22,28,36,39]. Detekcja OL w zakresie milisekundowym wymaga użycia specjalnych urządzeń (zwykle stosuje się fosforoskopy).

Rejestrując opóźnioną luminescencję w zakresie sekundowym można badać początkowe reakcje fotosyntezy [11,15,21], określać zawartość chlorofilu [29] oraz biomasę zawartą w fitoplanktonie [30], oceniać zanieczyszczenie gleby i wody herbicydami [25,26], a także wrażliwość roślin na herbicydy [24,27]. Można badać także wpływ różnych czynników fizyko-chemicznych na początkowe reakcje fotosyntezy [2,3,31,33,42]. Na podkreślenie zasługuje fakt, że detekcja opóźnionej luminescencji w zakresie sekundowym praktycznie jest mało wykorzystywana. Spowodowane jest to zapewne brakiem profesjonalnych urządzeń do jej pomiaru na rynku aparaturowym. Istniejące w sprzedaży różnego typu fluorymetry służą do pomiaru indukcji fluorescencji.

W ostatnich kilkunastu latach często wykorzystywana jest indukcja fluorescencji (tzw. efekt Kautskiego) w badaniach fotosyntezy i wpływu na nią różnych czynników [5,14,16,18,32,41]. Pomiary wykonuje się na liściach adaptowanych do ciemności. Analizując kinetyki szybkich zmian fluorescencji po włączeniu światła wzbudzającego (w czasie do ok. 1s) uzyskuje się cenne informacje o funkcjonowaniu początkowego etapu przenoszenia energii w fotosystemie II w trakcie uruchamiania reakcji świetlnych fotosyntezy. Rejestrując również wolne zmiany fluorescencji w czasie do kilku minut, można uzyskać pełniejszą informację o przebiegu reakcji w fotosyntetycznym transporcie.

PIŚMIENNICTWO

1. **Andréasson L.E., Vänngard T.:** Electron transport in photosystem I and II, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39, 279-411, 1988.
2. **Brzóstowicz A.:** Determination of delayed photosynthetic apparatus luminescence as a possible method of frost resistance evaluation in wheat leaves. *Acta Physiol. Plant.* 12 (3), 187-191, 1990
3. **Brzóstowicz A.:** Influence of DCMU on the temperature dependence of the delayed luminescence intensity in wheat leaves. *Photosynthetica.* 25 (2), 219-221, 1991.
4. **Brzóstowicz A.:** Zastosowanie opóźnionej luminescencji do badania wpływu niskiej temperatury na rośliny uprawne, *Rozprawy nr 188, Praca hab., Wyd. AR Szczecin*, 1999.
5. **Clement J.M., Van Hasselt P.R.:** Chlorophyll fluorescence as a parameter for frost hardiness in winter wheat: A comparison with other hardiness parameters, *Phyton* 36 (1), 45-56, 1996.
6. **Davenport J.W., McCarty R.E.:** Relationships between rates of steady-state ATP synthesis and magnitude of the proton-activity gradient across thylakoid membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 851, 136-145, 1986.
7. **Džanumov D.A., Bočarov E.A., Klimov S.V.:** Biofizičeskii metod opredelnia mrozoustoičivosti ozimych pšenic na rannich etapach proraščivaniia. *Sel'.-choz. biol.*, 13(2), 302-306, 1978.
8. **Frąckowiak D., Więckowski St., Waloszek A., Planner A., Ptak A., Hanyż I., Goc J.:** Chlorophyll-carotenoids interactions in model systems and in organisms investigated by photoacoustic spectroscopy, *Cur. Top. in Biophys.* 19 (2), 71-79, 1995.
9. **Gaevskii N. A., Morgun V. N.:** Ispolzovanie peremennoi i zamedlennoi fluorescencii chlorofilla dla izučeniia fotosinteza rasteni. *Fiziol. Rast.* 40 (1), 136-145, 1993.
10. **Govindjee, Amez J., Fork D.Ch. /ed.:/** Light emission by plants and bacteria. Academic Press, INC (London) Ltd. 1986.
11. **Hideg E., Kobayashi M., Inaba H.:** The far red induced slow component of delayed light from chloroplasts is emitted from Photosystem II, *Photosynth. Res.* 29, 107-112, 1991.
12. **Kacperska A.:** Odporność roślin na stresowe, abiotyczne czynniki środowiska i metody jej oceny, *Post. Nauk Roln.* 1-2, 21-32, 1991.
13. **Kopcewicz J., Lewak S. /red.:/** Podstawy fizjologii roślin, PWN Warszawa, 1998.
14. **Krause G.H., Weis E.:** Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 313-349, 1991.
15. **Lavorel J.:** Luminescence. W: Govindjee /ed./, *Bioenergetics of photosynthesis*, New York, Academic Press, 223-317, 1975.
16. **Lichtenthaler H.K.:** The Kautsky effect: 60 years of chlorophyll fluorescence induction kinetics, *Photosynthetica* 27 (1-2), 45-55, 1992.

17. **Lichtenthaler H.K.:** Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J. Plant Physiol.* 148, 4-14, 1996.
18. **Lichtenthaler H.K., Rinderle U.:** The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants, *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry* 19 (Suppl. 1), S29-S85, 1988.
19. **Litvin F.F., Šuvalov V.A.:** Dlitel'noe poslesvečenie chlorofilla v rasteniiach i lovuški energii pri fotosinteze, *DAN SSSR* 181 (3), 733-736, 1968.
20. **Mitchell R.A.C., Barber J.:** Adaptation of photosynthetic electron-transport rate to growth temperature in pea, *Planta* 169, 429-436, 1986.
21. **Morgun V.N., Doldzhikov S.V.:** Hig-energy state of chloroplasts measured as function of light induced changes of delayed fluorescence and energetic effectivity of photosynthesis of pea leaves, *Photosynthetica* 24 (4), 556-562, 1990.
22. **Morgun V.N., Grigor'ev Yu. S., Gekhman A.V.:** The relation of light-induced changes of chlorophyll delayed fluorescence and CO₂ fixation of plants, *Photosynthetica* 26 (4), 571-577, 1992.
23. **Murkowski A.:** Fotosyntetyczna luminescencja wskaźnikiem stanu fizjologicznego rośliny i jej odporności na ekstremalne czynniki zewnętrzne, *Post. Nauk Roln.* 4, 3-16, 1974.
24. **Murkowski A.:** Luminescencyjne metody badania wpływu herbicydów na organizmy fotosyntetyzujące, *Praca doktorska, AR Szczecin*, 1975.
25. **Murkowski A., Brzóstowicz A.:** Luminescencyjna metoda oznaczania pozostałości herbicydów - inhibitorów fotosyntezy w glebie i wodzie. *Biofizyka - Prace doświadczalne. WSRP Siedlce*, 157-175, 1980.
26. **Murkowski A., Brzóstowicz A., Grabikowski E., Prokowski Z.:** Luminescencyjna metoda bioindykacji fitotoksycznych zanieczyszczeń środowiska. *Post. Fiz. Med.* 17, 3/4, 85-91, 1982
27. **Murkowski A., Skórska E.:** Ocena wrażliwości pszenżyta na herbicydy triazynowe, *Zesz. Nauk. AR w Szczecinie* 162, 179-183, 1994.
28. **Nikolenko V.F., Savin V.N., Styk B., Grundas S.:** Heat resistance of certain varieties of spring wheat, *Proceedings of Symposium on „Methods of biochemical evaluation of germplasm collection”*, IHAR Radzików, 19-20.06.1986, 162-168, 1986.
29. **Prokowski Z., Brzóstowicz A., Grabikowski E., Murkowski A.:** Wykorzystanie detekcji luminescencji aparatu fotosyntetycznego do określania zawartości chlorofilu *a* w fitoplanktonie. *Studia i Materiały Oceanologiczne* 49, *Fizyka Morza* 14, PAN KBM, 79-90, 1985.
30. **Prokowski Z., Brzóstowicz A., Grabikowski E., Murkowski A.:** Wykorzystanie fotoindukowanej luminescencji do ilościowego określania biomasy fitoplanktonu. *Zesz. Prob. Post. Nauk Rol.*, 351, 41-48, 1988.

31. Prokowski Z.: Effects of $HgCl_2$ on long-delayed luminescence in *Scenedesmus quadricauda*, *Photosynthetica* 28 (4), 563-566, 1993.
32. Schreiber U., Bilger W.: Rapid assessment of stress effects on plant leaves by chlorophyll fluorescence measurements, Tenhunen J.D. et al. /ed./, NATO ASI Series G 15, 27-53, 1987.
33. Skórska E., Murkowski A.: Photosynthetic luminescence detection as the quick test of chilling-resistance of cucumber plants, *Hod. Rośl. Aklimat. i Nasien.* 32 (1/2), 285-289, 1988.
34. Starck Z., Choluj D., Niemyska B.: Fizjologiczne reakcje roślin na niekorzystne czynniki środowiska, Wyd. SGGW, Warszawa, 1995.
35. Steffen K. L., Palta J.P.: Photosynthesis as a key process in plant response to low temperature: Alteration during low temperature acclimation and impairment during incipient freeze-thaw injury, W: Liss A. R. /ed./, *Plant Cold Hardiness*, 67-99, 1987.
36. Stein U., Buschmann C., Blaich R., Lichtenthaler H.K.: Induction kinetics of delayed fluorescence of sun and shade leaves of *Fagus sylvatica* in the ms-range. *Radiat Environ. Biophys* 29, 119-128, 1990.
37. Strehler B.L., Arnold W.A.: Light production by green plants, *J. Gen. Physiol.* 34, 809-820, 1951.
38. Šuvalov V.A., Klimov V.A.: Perviĉnye processy perenosa elektrona i strukturnaia organizacia reakcionnych centrov fotosinteza, *Biofizyka* XXXII (5), 814-829, 1987.
39. Terzaghi W.B., Fork D.C., Berry J.A., Field Ch.B.: Low and high temperature limits to PSII: A survey using trans-parinaric acid, delayed light emission, and Fo chlorophyll fluorescence, *Plant Physiol.* 91, 1494-1500, 1989.
40. Vasil'ev I.R., Venediktov P.S.: Effects of pH and chemicals affecting polypeptide conformation on inhibition of reducing and oxidizing sides of photosystem 2 by DCMU in pea chloroplasts, *Photosynthetica* 29 (4), 595-602, 1993.
41. Verheul M.J., Van Hassel P.R., Stamp P.: Comparison of maize inbred lines differing in low temperature tolerance: Effect of acclimation at suboptimal temperature on chloroplast functioning, *Annals of Botany* 76, 7-14, 1995.
42. Veselovskii V. A., Veselova T. V.: *Luminescencia rasteni*, Moscov, Nauka, 1990.
43. Weis E.: Light- and temperature-induced changes in the distribution of excitation energy between photosystem I and photosystem II in spinach leaves, *Biochim. et Biophys. Acta* 807, 118-126, 1985.
44. Witt H.T.: Primary acts of energy conservation in the functional membrane of photosynthesis. W: Govindjee /ed./ *Bioenergetics of photosynthesis*, Acad. Press, New York, 493-554, 1975.
45. Wróbel D.: Barwniki fotosyntetyczne w organizmach i anizotropowych układach modelowych, *Zagadnienia Biofizyki Współczesnej* 15 (2), 3-29, 1990.
46. Öquist G.: Stress and adptation in photosynthesis. W: Douglas R. H., Moan J., Dall'Acqua F. /ed./, *Light in biology and medicine*, 1, 433-440, 1988.

LUMINESCENCE OF PHOTOSYNTHESIS

A. Brzóstowicz

Department of Physics, University of Agriculture, Papieża Pawła VI No 3, 71-459 Szczecin

e-mail: fizyka@dedal.man.szczecin.pl

Summary: The primary reactions of photosynthesis and different kinds of their luminescence are shown in this work.

Keywords: luminescence, photosynthesis.