

**... ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН ...**

УДК: 577.3

**Применение метода индукции флуоресценции хлорофилла для изучения неоднородности системы фотосинтеза растений****Н.В.Байрак, В.А.Зуза, Я.А.Погромская**

*Донецкая опытная станция Национального научного центра «Институт почвоведения и агрохимии имени А.Н.Соколовского» УААН (Донецкая обл., пос. Новгородское, Украина)  
joanap@mail.ru*

С помощью метода ИФХ при использовании флуориметра «Флоратест» показаны различия функциональной организации системы фотосинтеза листьев разного возраста, теневых и световых листьев и особенности листьев, пигментированных антоцианом. Предложен расчетный показатель для оценки эффективности донорной стороны ФС2. Показано, что регуляция фотосинтеза может осуществляться как на уровне индивидуальной ФС2, так и на уровне пула через изменение соотношения между Q<sub>v</sub>-восстанавливающими и Q<sub>v</sub>-невосстанавливающими ФС2.

Ключевые слова: *флуоресценция, первичные процессы фотосинтеза (ППФ), фотосистема 2 (ФС2), антоциановая пигментация, Rosa indica var. fragrant hybr., Armeniaca vulgaris Lam., Populus pyramidalis Borkh.*

**Введение**

Покрывание листьями растений представляет собой неоднородную систему. На одном растении могут присутствовать одновременно световые и теневые листья, листья, различные в онтогенетическом плане: только что появившиеся юные, развивающиеся молодые и вполне сформировавшиеся листья.

Известно, что фотосинтетическая функция претерпевает изменения в процессе онтогенеза. У очень молодых листьев интенсивность фотосинтеза невелика, затем она увеличивается до определенного критического уровня зрелости (обычно до полного развертывания листьев), в дальнейшем с увеличением возраста понижается (Крамер, Козловский, 2003). Показано, что по мере развития листа изменяется организация мембран хлоропластов, физико-химические свойства тилакоидов гран и, в связи с этим, – рН-зависимость и абсолютные значения электронного транспорта через ФС2 и цитохромный b/f-комплекс, состав и соотношение пигментов (Лысенко, 2001).

Кроме того, для многих растений характерна стадия развития, когда в листьях накапливается антоциан. Антоцианам, как флавоноидам, пигментам фенольной природы, отводится защитная функция от фотоповреждения и субоптимальных температур. Их локализация – клеточный сок вакуолей эпидермальных клеток и кутикула. По Бриттону (Бриттон, 1986), небольшое количество флавоноидов содержится в хлоропластах растений. Общепринятым является мнение о неучастии антоцианов в фотосинтетических процессах. Однако в работе (Заяц, 2001) разработана концепция биологической роли красных пигментов в фотосинтезе. Установлено, что антоцианы краснолистных растений изменяют оптику листа (Мерзляк, 1998), повышают поглощение солнечной энергии в пределах видимой радиации (380–700 нм) в среднем на 8–12 % (Заяц, 2001).

Световые, подверженные прямому облучению, и теневые, использующие рассеянный свет, листья в большинстве случаев имеют существенные морфологические различия и различия в механизме фотосинтеза. Для световых листьев характерна более высокая интенсивность фотосинтеза на единицу листовой поверхности, кроме того, они содержат больше карбоксилирующих ферментов и переносчиков электронов на единицу листовой поверхности, чем теневые листья (Крамер, Козловский, 2003).

Представление о листовном покрове растения как о системе различных в морфологическом и биохимическом плане листьев, позволяющей максимально использовать энергию света, требует детального изучения нюансов, оптимизирующих фотосинтез. В связи с этим представляется интересным изучение разновозрастных листьев индивидуального растения, а также теневых и световых листьев, листьев, пигментированных антоцианом, на предмет различий в механизме первичных процессов фотосинтеза (ППФ).

Целью наших исследований являлось изучение особенностей ППФ в зависимости от освещенности листа, возраста и пигментации антоцианом, а также адаптирование метода индукции

флуоресценції хлорофілла к исследованиям ФС2 с помощью отечественного флуориметра «Флоратест», находящегося в стадии разработки (сайт научно-производственной фирмы «Рост»).

### Материалы и методы

Объектом исследований являлись растения садовой розы *Rosa indica* var. *fragrant* hybr. сорта «Black Magic», а также листья абрикоса обыкновенного (*Armeniaca vulgaris* Lam.) и тополя пирамидального (*Populus pyramidalis* Borkh.) различной локализации и на различных стадиях развития. Изучали особенности ППФ теневых и световых, а также антоциансодержащих листьев с помощью метода индукции флуоресценции хлорофілла (ИФХ) (Корнеев, 2002). Детектировали флуоресценцию верхней стороны листовой пластинки, у розы – красных и зеленых верхних, и нижних зеленых теневых листьев. Исползованные листья абрикоса и тополя сформированы в нижней части кроны. Для розы измерения проводили как *in vivo*, так и на сорванных листьях в лабораторных условиях. Для абрикоса и тополя флуоресценцию измеряли только лабораторно. Работу с растениями розы проводили как в осенний период, в октябре 2007 года в условиях теплицы, так и в весенний период, в мае 2008 года в условиях открытого грунта. Образцы листьев тополя и абрикоса отбирали и анализировали в мае 2008 года. Замеры производили в четырехкратной повторности. Для математической обработки результатов использовали пакет STATISTICA 6.

Метод ИФХ состоит в детектировании флуоресценции хлорофілла, индуцируемой при освещении адаптированного к темноте листа растения. Зависимость интенсивности флуоресценции от времени известна как «кривая ИФХ» или «кривая Каутского» (Корнеев, 2002). Нелинейность кривой ИФХ определяется кинетическими особенностями ППФ, состоянием светособирающего комплекса (ССК), реакционного центра (РЦ), акцепторной части фотосистемы 2 (ФС2) и донорной (системой фотолиза воды), работой электронтранспортной цепи (ЭТЦ) и сопряжением световой и темновой фаз фотосинтеза, а также альтернативными процессами, потребляющими энергию кванта (Бриттон, 1986). Учитывая, что флуоресценция – непродуктивный путь реализации энергии кванта, интенсивность ее несет информацию о «КПД» фотосистемы. Суть ППФ – поглощение и передача энергии кванта ССК, захват возбуждения реакционным центром и стабилизация его разделением зарядов, передача электрона из реакционного центра первичному акцептору Qa, дальнейшее вовлечение  $\bar{e}$  через акцептор Qв в ЭТЦ и аккумуляция энергии в виде АТФ и НАДФН, компенсация положительного заряда РЦ донорной частью ФС2, сопряженной с фотолизом воды кислородвыделяющим комплексом (КВК). В отсутствие света РЦ нейтрален, первичный акцептор Qa окислен. При освещении адаптированного к темноте листа происходит разделение зарядов (РЦ $\rightarrow$  РЦ $^+$ + $\bar{e}$ ), восстановление Qa электроном из РЦ и постепенное заполнение цепи электронного потока от системы фотолиза воды через ряд посредников к конечному акцептору электронов. Лимитирующие стадии этого процесса отражаются в изменении интенсивности флуоресценции. Какие-либо функциональные изменения системы меняют вид кривой ИФХ (Рубин, Кренделева, 2003).

В данной работе использовали хронофлуориметр «Флоратест», разработанный в Институте кибернетики НАН Украины. Адаптация листа к темноте составляла 5 мин. Длина волны освещения в максимуме 470 $\pm$ 15 нм; освещенность в границах пятна не менее 20 Вт/м<sup>2</sup>. Спектральный диапазон измерения флуоресценции составляет 670–800 нм. Измерения проводили в режиме 10 с, т. е. детектировалась быстрая индукция флуоресценции хлорофілла А (Хла) ФС2 (Корнеев, 2002).

Интерпретацию кривой ИФХ проводили в соответствии с ОЖР-кинетикой, учитывающей активность КВК ФС2 (Корнеев, 2002; Fracheboud, 2004). Учитывая, что начальная точка замера для прибора «Флоратест» равна 1 мс, принимается некоторое допущение в интерпретации характерных точек кривой Каутского. F<sub>0</sub> – интенсивность флуоресценции Хла при «открытых» РЦ ФС2, когда все Qa окислены. Временной интервал достижения этой точки – до 0,1 мс (Fracheboud, 2004). Поэтому первые значения показаний флуориметра «Флоратест», принимаемые по рекомендации разработчиков как F<sub>0</sub> (Галелюка та ін., 2006), чаще отображают этот показатель с некоторым приближением, определяемым чувствительностью прибора. F<sub>p</sub> – интенсивность флуоресценции Хла при «закрытых» РЦ ФС2, когда все Qa восстановлены и не могут принимать  $\bar{e}$  от РЦ; F<sub>j</sub> – точка кривой ИФХ, определяемая количеством Qв-невосстанавливающих ФС2, систем, у которых отсутствует контакт между двумя последовательными акцепторами Qa и Qв; F<sub>1</sub> – точка кривой ИФХ, определяемая эффективностью донорной части ФС2 (системы фотолиза воды); t<sub>0,5</sub> – время достижения половины значения флуоресценции F<sub>p</sub>.

Для анализа использовали расчетные показатели (Корнеев, 2002) (индексация адаптирована к ОЖР-кинетике): F<sub>v</sub>=F<sub>p</sub>-F<sub>0</sub> – переменная флуоресценции; F<sub>v</sub>/F<sub>p</sub> – эффективность ФС2; (F<sub>j</sub>-F<sub>0</sub>)/F<sub>v</sub> – доля Qв-невосстанавливающих ФС2 (обратная величине Qв-восстанавливающих); (F<sub>j</sub>-F<sub>0</sub>)/F<sub>p</sub> – эффективность разделения заряда, величина, характеризующая качество ССК и РЦ ФС2; (F<sub>p</sub>-F<sub>j</sub>)/F<sub>p</sub> – эффективность ЭТЦ.

### Результаты и обсуждение

Для оценки эффективности донорной стороны ФС2 использовали показатель  $(F_p - F_o)/F_i = F_v/F_i$  – эффективность фотолиза. После формирования пика  $F_j$  (момент восстановления всех пластохинонов Qa в Qb-невосстанавливающих ФС2) скорость потока электронов с донорной стороны становится соизмерима со скоростью восстановления пула Q. Когда скорость нейтрализации положительного заряда РЦ<sup>+</sup> становится лимитирующей, формируется пик  $F_1$ . Чем меньше эффективность электронной компенсации в РЦ, тем выше  $F_1$ . Отношение  $F_v/F_i$ , величина переменной флуоресценции на единицу  $F_i$ , показывает количество эффективно утилизированной ФС2 энергии света на единицу потери энергии за счет донорной стороны. Показатель можно использовать в грубом приближении, как характеристику качества системы фотолиза.

При анализе данных, полученных по трем видам растений для листьев *in vivo* и в лабораторных условиях, было установлено, что замеченные тенденции универсальны в пределах опыта, это дает возможность экстраполяции на широколиственные растения в целом.

Так, обнаружено, что на состоянии ФС2 существенно влияет возраст листа. С увеличением степени зрелости эффективность ФС2 возрастает. При этом увеличение эффективности ФС2 сопряжено со снижением доли Qb-невосстанавливающих систем (0,482 для молодых непигментированных и 0,257 для зрелых листьев), ростом эффективности ЭТЦ (0,308 для молодых непигментированных и 0,489 для зрелых листьев) и эффективности фотолиза, а также увеличением  $t_{0,5}$  (табл. 1).

Таблица 1.

Показатели состояния ФС2 листьев разного возраста

Возраст листа	$F_p - F_o$	Эффективность ФС2	Доля Qb-невосстанавливающих ФС2	Эффективность разделения заряда	Эффективность ЭТЦ	Эффективность фотолиза	$t_{0,5}$ МС
Молодой	0,125	0,617	0,467*	0,282*	0,334*	0,854	146,20*
Зрелый	0,105	0,627	0,189*	0,118*	0,509*	0,956	182,26*

Примечание: \* – различия достоверны при  $p < 0,05$ .

Таким образом, максимальной эффективности фотосистема достигает постепенно, в процессе формирования листа. Для функционально зрелого листа характерен четко отлаженный путь транспорта электронов от воды по ЭТЦ при снижении интенсивности альтернативных процессов потребления  $e^-$  (о чем свидетельствует рост  $t_{0,5}$ ) и относительно низкая эффективность разделения зарядов, что может являться результатом формирования защитных механизмов от фотоповреждения. У молодых же листьев низко значение  $t_{0,5}$  и высокая доля Qb-невосстанавливающих систем, что говорит об интенсивности синтетических процессов. Большое количество ФС2 находится на стадии сборки и не участвует в электронном транспорте, но флуоресцирует в том же волновом диапазоне. Максимальная эффективность разделения зарядов говорит о том, что необходимо больше энергии для поддержания достаточной интенсивности электронного потока и энергетической поддержки ростовых процессов. Однако это создает угрозу фотоповреждения, что вызывает необходимость дополнительной защиты, например, в виде антоциановой пигментации.

Листья, сформировавшиеся в тени и на прямом свете, также отличались по показателям, характеризующим систему фотосинтеза (табл. 2).

Световые листья чаще имеют более низкую эффективность ФС2, фотолиза и ЭТЦ, а также показатель  $t_{0,5}$  и более высокую, чем теневые, долю Qb-невосстанавливающих систем (0,487 против 0,325 для теневых). Это говорит о снижении чувствительности к свету за счет интенсификации светозащитных механизмов и возможном включении альтернативных путей потребления электрона (падение  $t_{0,5}$ ), а также о необходимости снижения интенсивности потока электронов через ЭТЦ на прямом свете, что достигается перераспределением соотношения между Qb-невосстанавливающими и Qb-восстанавливающими ФС2. Теневые листья, исходя из полученных данных, обладают более чувствительной к свету фотосинтетической системой, интенсивнее флуоресцируют ( $F_p$  выше, чем у световых),  $t_{0,5}$  на рассеянном свете также выше, что перекликается с данными работы (Китаев, 1985).

Таблица 2.

## Показатели ФС2 световых и теневых листьев

Лист	Fp-Fo	Эффективность ФС2	Доля Qb-невосстанавливающих ФС2	Эффективность разделения заряда	Эффективность ЭТЦ	Эффективность фотоллиза	T <sub>0,5</sub> мс
Световой	0,081*	0,586*	0,498	0,304	0,282*	0,795*	175,75
Теневой	0,115*	0,694*	0,325	0,226	0,468*	1,026*	212,65

Примечание: \* – различия достоверны при  $p \leq 0,05$ .

Световые листья часто пигментированы, особенно молодые. Заметно, что влияние пигментации антоцианом углубляет отличия световых листьев от теневых. Пигментация еще более снижает эффективность ФС2, эффективность фотоллиза и T<sub>0,5</sub> (табл. 3).

Таблица 3.

## Влияние пигментации световых листьев антоцианом

Растение	Пигментация антоцианом	Fp-Fo	Эффективность ФС2	Доля Qb-невосстанавливающих ФС2	Эффективность разделения заряда	Эффективность ЭТЦ	Эффективность фотоллиза	T <sub>0,5</sub> мс
Роза, теплица	Есть	0,046	0,443*	0,640	0,284	0,160	0,506	118,28
	Нет	0,068	0,629*	0,786	0,494	0,135	0,727	131,38
Роза, лабораторный опыт	Есть	0,078	0,552	0,312	0,172	0,379	0,842	163,53*
	Нет	0,093	0,543	0,211	0,114	0,429	0,864	220,12*
Абрикос	Есть	0,054*	0,524	0,455	0,238	0,286	0,611	117,32*
	Нет	0,103*	0,656	0,333	0,219	0,438	1,050	160,25*
Тополь	Есть	0,127	0,684	0,231	0,158	0,526	0,703	89,31*
	Нет	0,147	0,577	0,600	0,346	0,231	0,658	132,16*

Примечание: \* – различия достоверны при  $p \leq 0,05$ .

В отличие от световых зеленых листьев, при пигментации происходит некоторое снижение эффективности разделения заряда (0,213 против 0,293 для непигментированных) и доли Qb-невосстанавливающих систем (0,410 против 0,482 для непигментированных). Т.е. насыщение потока электронов достигается в максимально короткие сроки при пониженной светочувствительности на уровне разделения зарядов и низкой эффективности фотоллиза за счет увеличения доли Qb-восстанавливающих ФС2. При этом пигментация снижает интенсивность флуоресценции. Уровень показателей F<sub>o</sub>, F<sub>p</sub>, F<sub>j</sub>, F<sub>i</sub> для пигментированного листа гораздо ниже, чем для светового зеленого листа того же возраста. Характерное для пигментированных листьев снижение общего уровня флуоресценции может быть результатом экранирования эпидермальным слоем при пересечении, в некоторой степени, оптических спектров поглощения антоцианового пигментирования и Хла, что весьма возможно при длине волны освещения в максимуме 470±15 нм, максимумах поглощения антоцианов в области 460–600 нм (Китаев, 1985) и в области 560 нм – одной из полос поглощения хлорофилла а (Мерзляк, 1998).

### Выводы

1. Для оценки эффективности донорной стороны ФС2 исходя из параметров кривой ИФХ можно использовать показатель  $(F_p - F_o)/F_i = F_v/F_i$ .
2. При функциональном созревании листа происходит увеличение эффективности ФС2 за счет роста эффективности фотолиза и ЭТЦ. При этом происходит перераспределение соотношения Qв-невосстанавливающих и Qв-восстанавливающих ФС2 в пользу последних, что может говорить о снижении интенсивности биосинтеза хлорофилла. Увеличение  $T_{0,5}$  с возрастом можно объяснить снижением интенсивности альтернативных процессов потребления электронов ЭТЦ, не связанных с ассимиляцией CO<sub>2</sub>. Молодые листья отличаются более высокой эффективностью разделения зарядов, что необходимо для поддержания достаточной интенсивности электронного потока и энергетической поддержки ростовых процессов. Однако это создает угрозу фотоповреждения, что вызывает необходимость при интенсивном освещении дополнительной защиты в виде антоциановой пигментации.
3. Световые листья отличаются от теневых более низкими  $T_{0,5}$  и эффективностью ФС2, фотолиза, ЭТЦ и более высокой долей Qв-невосстанавливающих ФС2. Это говорит о том, что фотопротекторные механизмы проявляются в снижении чувствительности к свету ФС2 и регуляции потока электронов снижением доли Qв-восстанавливающих ФС2.
4. Пигментация антоцианом экранирует хлорофилл в сине-зеленой части спектра, максимально снижает эффективность фотолиза и  $T_{0,5}$ , уменьшает эффективность разделения зарядов, но увеличивает относительное количество Qв-восстанавливающих ФС2.
5. Функциональные различия теневых, световых пигментированных и непигментированных листьев определяются необходимостью повышения чувствительности к свету и более полной утилизации его энергии при фотосинтезе в одном случае и «борьбы» с избыточным световым потоком в остальных случаях. Защита от фоторазрушения проявляется в снижении чувствительности ФС2 к свету и регуляции потока электронов. Пигментация антоцианом выполняет роль экрана, включая при этом дополнительные Qв-восстанавливающие ФС2 для поддержки уровня интенсивности фотосинтеза.
6. Регуляция светопотребления для фотосинтеза может осуществляться как на уровне индивидуальной ФС2, так и на уровне пула ФС2 через изменение соотношения между Qв-восстанавливающими и Qв-невосстанавливающими.

Таким образом, в работе показана возможность применения флуориметра «Флоратест», с определенным приближением, для оценки состояния ФС2 в соответствии с ОЖП-кинетикой, а также определены существенные функциональные различия ФС2 в зависимости от светового режима, возраста и антоциановой пигментации листа.

### Список литературы

- Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. – М.: Мир, 1986. – С. 152–154.
- Галелюка І.Б., Качановська М.С., Сарахан Є.В. Портативний флуориметр для експрес-діагностики стану рослин: методи віртуального проектування і результати дослідного використання. – Київ, 2006. – 53с.
- Заяц В.А. Биологические и хозяйственные свойства, перспективы выращивания персика в зоне Украинских Карпат. Автореф. дисс. ... д-ра с.-х. наук: 06.01.07 / Национальный аграрный университет. – Киев, 2001. [Электронный документ]. (<http://www.lib.ua-ru.net/inode/p-3/14281.html>).
- Китаев О.И. Флуоресцентные микроспектральные исследования физиологических особенностей плодовых и ягодных растений в связи с их зимостойкостью. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.12 / Институт физиологии и биохимии растений. – Кишинев, 1988 – 19с.
- Корнеев Д.Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла. – К.: Альтапрес, 2002. – 188с.
- Крамер П.Д., Козловский Т.Е. Физиология древесных растений. – 2003. [Электронный документ]. ([ftp://193.138.147.82/LIB\\_SITE/0--MOLBIOL/Fiziologija%20Drevesnjh%20Rastenij/](ftp://193.138.147.82/LIB_SITE/0--MOLBIOL/Fiziologija%20Drevesnjh%20Rastenij/)). (<http://www.bonsai.ru/dendro/phcontent.html>).
- Лысенко Г.Г. Транспорт электронов в хлоропластах листьев разного возраста у растений пшеницы и ячменя: нециклический транспорт в фотосистемах 1 и 2 // Вестник Башкирского университета. – 2001. – №2 (1). – С. 58–61.
- Мерзляк М.Н. Пигменты, оптика листа и состояние растений // Соросовский образовательный журнал. Биология. – 1998. – №4. – С. 19–24.
- Научно-производственная фирма «РОСТ» (<http://www.rost.com.ua/starteng.php?main=http%3A/www.rost.com.ua/aboutfirmeng.htm>).

Рубин А.Б., Кренделева Т.Е. Регуляция первичных процессов фотосинтеза // Успехи биологической химии. – 2003. – Т.43. – С. 225–266.

Fracheboud Yvan Using chlorophyll fluorescence to study photosynthesis. – 2004. (<http://www.ab.ipw.agrl.ethz.ch/~yfracheb/flex.htm>).

#### **Застосування методу індукції флуоресценції хлорофілу для вивчення неоднорідності системи фотосинтезу рослин**

**М.В.Байрак, В.О.Зуза, Я.А.Погромська**

За допомогою методу ІФХ при використанні флуориметра «Флоратест» показані розходження функціональної організації системи фотосинтезу листів різного віку, тінювих і світлових листів і особливості листів, пігментованих антоціаном. Запропоновано розрахунковий показник для оцінки ефективності донорної сторони ФС2. Показано, що регуляція фотосинтезу може здійснюватися як на рівні індивідуальної ФС2, так і на рівні пула, через зміну співвідношення між ФС2, що відновлюють Q<sub>в</sub> та не відновлюють.

Ключові слова: *флуоресценція, первинні процеси фотосинтезу (ППФ), фотосистема 2 (ФС2), антоціанова пігментація, Rosa indica var. fragrant hybr., Armeniaca vulgaris Lam., Populus pyramidalis Borkh.*

#### **Application of induction of chlorophyll fluorescence method for studying heterogeneity of plants photosynthesis system**

**N.V.Bajrak, V.A.Zuza, Ya.A.Pogromskaja**

With the help of induction of chlorophyll fluorescence method at use of a fluorimeter «Floratest» distinction of the functional organization of photosynthesis system of leaves of different age, shadow and light leaves and features of anthocyanin pigmented leaves are shown. The calculated parameter for an estimation of efficiency of the donor side of PS2 is offered. It is shown, that regulation of photosynthesis can be carried out both at a level of individual PS2, and at a level of a pool through change of a ratio between Q<sub>в</sub>-restoring and Q<sub>в</sub>-unrestoring PS2.

Key words: *fluorescence, primary processes of photosynthesis, photosystem 2, anthocyanin pigmentation, Rosa indica var. fragrant hybr., Armeniaca vulgaris Lam., Populus pyramidalis Borkh.*

---

**Представлено: С.М.Тимчуком**

**Рекомендовано до друку: В.В.Жмурком**