

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени
М.В.ЛОМОНОСОВА» ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ

КАФЕДРА ОБЩЕЙ ФИЗИКИ

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

**«Флуоресцентные показатели листьев растений при разном содержании
хлорофилла»**

Выполнила студентка
405 группы
Спицына Анна Алексеевна

Научный руководитель:
д.ф-м.н., проф. В.А. Караваев

Допущена к защите: _____

Зав.кафедрой д.ф-м.н. проф. Салецкий А.М.

Москва
2018

Оглавление

Введение	3
1. Обзор литературы	5
1.1. Структурно-функциональная организация фотосинтетического аппарата высших растений	5
1.2. Медленная индукция флуоресценции фотосинтезирующих объектов	9
1.3. Спектры флуоресценции листьев растений	12
1.4. Флуоресцентные показатели импульсной флуориметрии	13
1.5. Метод импульсной флуориметрии	16
2. Объекты и методы исследования	20
2.1. Объекты исследования	20
2.2. Регистрация спектров флуоресценции	22
2.3. Регистрация кинетик флуоресценции методом импульсной флуориметрии	22
2.4. Измерение содержания хлорофилла в листьях	24
3. Результаты и обсуждения	25
3.1. Опыты с листьями рябины в условии осенней деградации хлорофилла и весеннего созревания	25
3.2. Эксперименты по выращиванию растений в различных условиях освещенности	33
Основные результаты и выводы	34
Список литературы	35

Введение

Существование и развитие жизни на нашей планете во многом определяется жизнедеятельностью растений. Они усваивают энергию солнечного света, синтезируют органические соединения, используемые в качестве продуктов питания животными, и наполняют атмосферу кислородом, обеспечивая тем самым необходимые условия для сохранения и развития жизни на Земле. И это все происходит с помощью единственного процесса, называемого фотосинтезом. Для понимания сущности жизнедеятельности растений важнейшей задачей является изучение современных представлений о фотосинтезе как функции, составляющей основу биоэнергетики.

В настоящее время в основном установлены состав и структура фотосинтетического аппарата растений, а также исследованы механизмы отдельных реакций фотосинтеза, начиная от поглощения света и кончая биохимическими реакциями синтеза углеводов. В последние годы для изучения структурной организации и аспектов функционирования фотосинтетического аппарата растений активно используются флуоресцентные методы. Среди них – метод, основанный на регистрации спектров флуоресценции листьев растений, а также метод импульсной флуориметрии. При этом взаимосвязи флуоресцентных параметров с физиологическими характеристиками растения остаются до конца не выясненными. Важной задачей является установление данных взаимосвязей, что поможет усовершенствовать неинвазивные методы экспресс-оценки физиологического состояния растений и увеличить точность интерпретации получаемых данных.

В данной работе указанные выше флуоресцентные методы были использованы для решения ряда задач, связанных с изучением особенностей

фотосинтетического аппарата растений, находящихся в различных физиологических условиях: в условиях осенней деградации хлорофилла; распускания листьев в весенний период; выращивание при различной освещенности.

1. Обзор литературы

Фотосинтез представляет собой сложный процесс, в результате которого за счет энергии солнечного света при участии воды и углекислого газа происходит синтез углеводов. Реакции фотосинтеза принято разделять на две группы процессов – световые и темновые стадии [1].

Результатом световой стадии фотосинтеза является образование молекулы аденазинтрифосфорной кислоты (АТФ) и восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН). Обязательное условие протекания световой стадии – воздействие света на фотосинтезирующий объект. Темновая стадия – это совокупность биохимических реакций, в результате которых происходит усвоение растением атмосферной углекислоты (CO_2) и образование углеводов, данные процессы могут происходить и в темноте [2].

1.1. Структурно-функциональная организация фотосинтетического аппарата высших растений

У высших растений процессы фотосинтеза протекают в хлоропластах – специализированных энергопреобразующих органеллах растительной клетки (рис. 1). Внутреннее пространство хлоропласта отделено от внешней среды двумя оболочками (внешней и внутренней мембранами) и заполнено протяженными мембранными структурами, которые образуют замкнутые пузырьки, называемые тилакоидами. Тилакоиды формируют плотно сжатые стопки – граны, соединяющиеся между собой межгранными тилакоидами. На один тилакоидный диск приходится в среднем 200 электронно-транспортных цепей (ЭТЦ) и порядка 10^5 молекул пигментов. Основными пигментами в

хлоропластах являются хлорофилл *a* (Хл *a*), хлорофилл *b* (Хл *b*), а также каротиноиды [3].

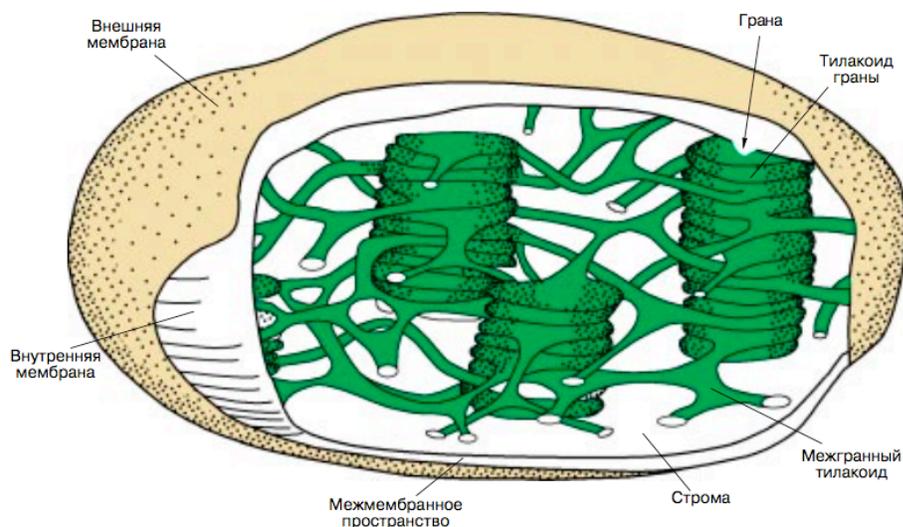


Рисунок 1. Строение хлоропласта [3]

Схема фотосинтетического аппарата представлена на рис. 2. Основным структурно-функциональным элементом фотосинтетического аппарата является фотосистема (ФС), включающая в себя светособирающую антенну, фотохимический реакционный центр (РЦ) и молекулы-переносчики электрона. Две фотосистемы, различающиеся по составу белков, пигментов и оптическим свойствам, участвуют в переносе электрона от H_2O к НАДФ^+ с поглощением двух квантов света. Комплексы фотосистемы 2 (ФС2) в основном локализованы в тилакоидах гран, а комплексы ФС1 располагаются в тилакоидах стромы [2,4].

Из-за различий в белковом и пигментном составе светособирающих антенн двух фотосистем пики в их спектрах поглощения несколько сдвинуты относительно друг друга: ФС1 поглощает длины волн $\lambda < 700 \div 730$ нм, а ФС2 – $\lambda < 680 \div 700$ нм. При окислении реакционных центров фотосистем происходит их обесцвечивание, характеризующееся изменениями спектров поглощения при $\lambda \approx 700$ и 680 нм. В этой связи реакционные центры ФС1 и ФС2 получили

название P700 и P680 [3,4].

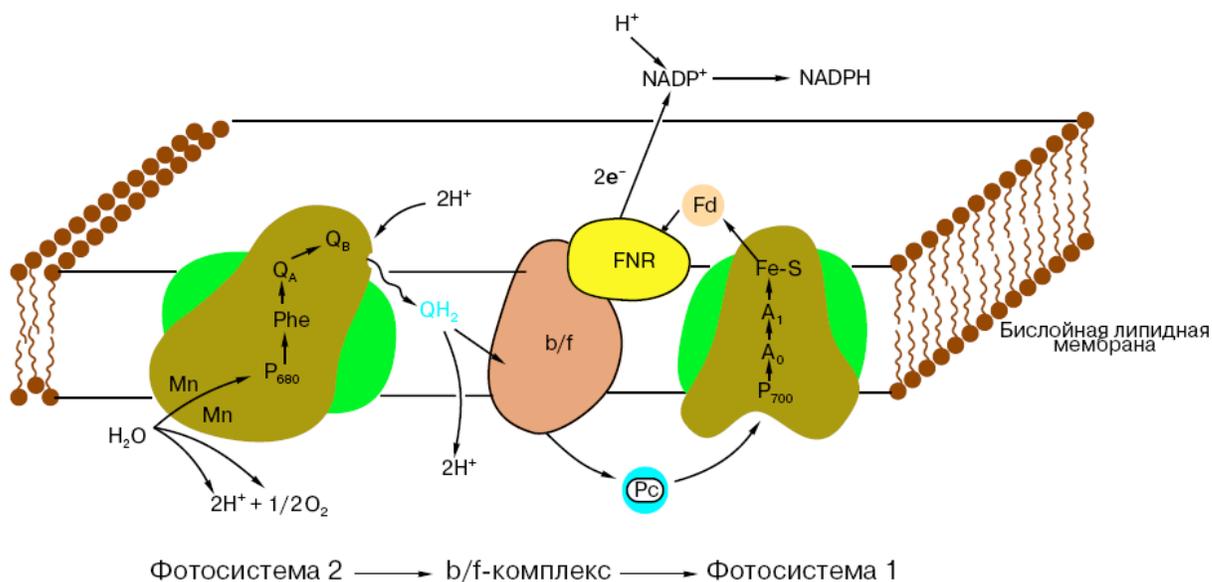


Рисунок 2. Фотосинтетический аппарат растений [3]

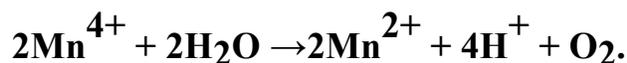
Светособирающие антенны по расположению делятся на так называемые «коровые» и периферические. Коровые, или собственные антенны состоят преимущественно из молекул хлорофилла *a*, в то время как периферические, образованные светособирающим комплексом (ССК), содержат как молекулы Хл *a*, так и Хл *b* [5,6]. Отсюда следует, что изменение отношения Хл *a* / Хл *b* может рассматриваться как указание на изменение соотношения содержания комплексов реакционных центров фотосистем и ССК в листе [7].

Вследствие неравномерного распределения фотосистем в гранальных и межгранных тилакоидах, часть ССК, связанная с ФС1 (ССК1), находится в тилакоидах стромы, а часть, связанная с ФС2 (ССК2), – в тилакоидах гран. Некоторая часть комплексов ССК2 является подвижной и способна увеличивать эффективное сечение поглощения либо ФС1, либо ФС2. Благодаря перемещению этих лабильных комплексов из гранальной области в стромальную и обратно осуществляется перераспределение энергии возбуждения между ФС. Данный механизм основан на обратимом фосфорилировании белка ССК и способен изменять соотношение между

нециклическим и циклическим электронными потоками, обеспечивая необходимое соотношение между количествами НАДФН и АТФ [8].

После поглощения кванта света молекула хлорофилла или вспомогательного пигмента светособирающей антенны переходит из основного в возбужденное состояние. Энергия возбуждения, мигрируя от одной молекулы пигмента к другой, за время порядка 10^{-9} с [9] попадает на РЦ: Р680в ФС2 и Р700в ФС1. В реакционном центре находится димер хлорофилла, в котором происходит разделение заряда, затем электрон быстро передается на первичные акцепторы. На один РЦ приходится 200 – 400 молекул хлорофилла светособирающих антенн, что позволяет обеспечить частое срабатывание фотореакционного центра даже при низких интенсивностях освещения. После разделения зарядов, происходящее за $\sim 10^{-12}$ с, заряды стабилизируются на время $\geq 10^{-2}$ с, что обеспечивает эффективный перенос электронов на стадиях, ограниченных диффузией [10].

Для восстановления, окисленного РЦ ФС2 используется электрон, полученный при окислении молекулы воды водорасщепляющим комплексом (ВРК). Разложение молекул воды происходит в марганецсодержащем кластере ВРК:



При передаче электрона, полученного в РЦ ФС1 после разделения зарядов, через ряд акцептеров ФС1 и ферредоксин-НАДФ-редуктазу происходит восстановление конечного акцептора электронов НАДФ⁺. ЭТЦ, переносящая электрон между фотосистемами по градиенту редокс-потенциала, состоит из подвижного переносчика пластохинона, цитохромного комплекса b_6/f , состоящего из цитохрома f и двух цитохромов b_6 , а также медьсодержащего белка пластоцианина (Рс), связывающего b_6/f -комплекс и Р700 (рис. 2). Описанный путь переноса электронов называется нециклическим

транспортом.

Также существует циклический транспорт электронов, при котором работает лишь ФС1. Активация циклического транспорта происходит при замедлении или прекращении окисления НАДФН в темновой стадии фотосинтеза. Таким образом, работа циклического и нециклического транспорта электронов регулируется количеством НАДФ⁺ в системе [11].

1.2. Медленная индукция флуоресценции фотосинтезирующих объектов

При освещении зеленого листа наблюдается явление флуоресценции, при котором ранее поглощенная энергия испускается молекулами хлорофилла в виде квантов света. После периода темновой адаптации интенсивность флуоресценции изменяется немонотонно (эффект Каутского). Изменения О-Ј-І-Р (рис. 3) называют быстрой индукцией флуоресценции (БИФ), ее продолжительность составляет 1-3 с. Более медленные изменения Р-S-M-T известны как медленная индукция флуоресценции (МИФ). Продолжительность МИФ – от нескольких десятков секунд до нескольких минут в зависимости от объекта и условий регистрации [12,13].

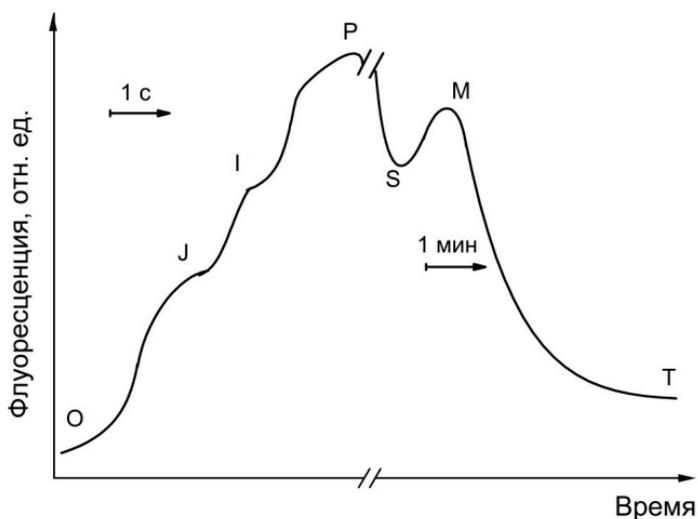


Рисунок 3. Схема индукционных изменений флуоресценции фотосинтезирующих объектов

Гипотеза Дюйзенса и Свирса рассматривает флуоресценцию и первичные реакции фотосинтеза как конкурирующие процессы. В соответствии с этой гипотезой индукционные изменения флуоресценции связаны с изменением состояния первичного акцептора электронов (Q_A) ФС2. В условиях длительной адаптации к темноте первичный акцептор находится в окисленном состоянии, и перенос электрона от РЦ ФС2 может происходить без задержек, при этом происходит тушение флуоресценции (уровень О на рис. 3). Интенсивность флуоресценции возрастает по мере восстановления первичных акцепторов и уменьшения потока электронов (состояния $Q_A^-Q_B$ и $Q_A^-Q_B^-$). Переход J-I интерпретируется как увеличение концентрации вторичного восстановленного переносчика Q_B , пик Р может означать достижение максимальной концентрации $Q_A^-Q_B^{2-}$ и восстановленного пластохинона [14].

Характерная кривая медленной индукции флуоресценции листьев растений представлена на рис. 4. Тушение Р-Т, как правило, монотонное для изолированных интактных хлоропластов. В случае листьев и водорослей наблюдается переход S-M-T или более сложная кинетика флуоресценции [12,15]. При освещении листа быстро активируется фермент ЭТЦ ферредоксин-НАДФ⁺-редуктаза и через несколько секунд после включения света происходит ускорение оттока электронов от ФС1, что способствует ускорению электронного транспорта между ФС2 и ФС1 и реокислению Q^- , при этом флуоресценция уменьшается. На стадии S-M происходит замедление электронного транспорта между ФС II и ФС I за счет генерации ΔpH на мембране тилакоидов.

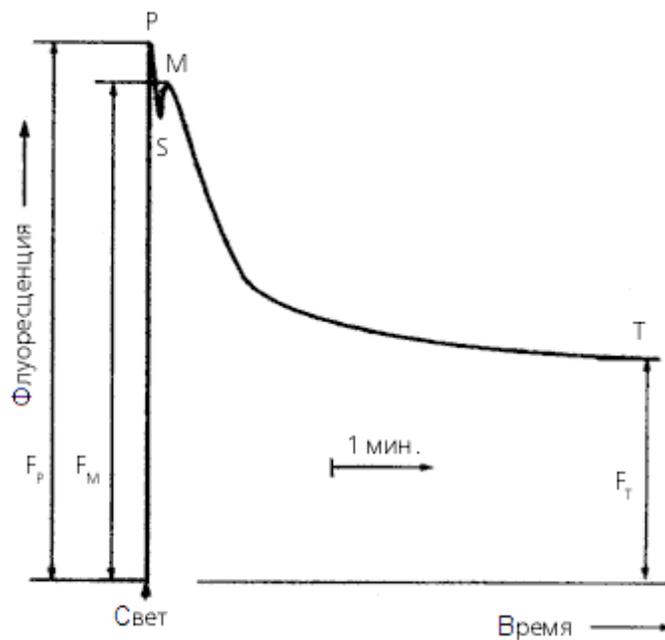


Рисунок 4. Характерная кривая медленной индукции флуоресценции (МИФ) листьев растений [16]

Тушение флуоресценции на стадии М-Т подразделяют на фотохимическое (qP), которое зависит от окислительно-восстановительного состояния первичных акцепторов электронов ФС2, и нефотохимическое (qN), непосредственно с этим состоянием не связанное. Нефотохимическое тушение, как предполагается, в основном обусловлено двумя факторами: (1) образованием градиента протонов ΔpH на мембране тилакоидов и (2) перераспределением энергии возбуждения в пользу ФС1 при обратимом фосфорилировании ССК2 ферментом протеинкиназой. Дефосфорилирование ССК2 осуществляется ферментом фосфатазой. На активность данных ферментов влияет окислительно-восстановительное состояние пула переносчиков электронов между ФС. Действие сразу нескольких механизмов регуляции уровня нефотохимического тушения обеспечивает согласованную работу обеих фотосистем.

Для количественной оценки кривой МИФ используют безразмерную величину – отношение $(F_M - F_T) / F_T$, где F_M – интенсивность флуоресценции в

момент достижения второго максимума (после включения освещения); F_T – стационарный уровень флуоресценции после нескольких минут освещения. Возможность использования этого показателя для оценки фотосинтетической активности растений была экспериментально и теоретически обоснована В.А. Караваевым [15]. Было показано, что относительные изменения значений $(F_M - F_T) / F_T$ при различных воздействиях на растение соответствуют относительным изменениям фотосинтетической активности (скорости выделения O_2 в расчете на хлорофилл).

1.3. Спектры флуоресценции листьев растений

Пигментный состав фотосинтетических антенных комплексов высших растений разнообразен. В него входят 2 вида хлорофиллов (Хл *a*, Хл *b*) и несколько видов каротиноидов (лютеин, виолоксантин, зеаксантин, неоксантин, β -каротин), однако принято считать, что способностью к флуоресценции *in vivo* обладают только молекулы Хл *a*, вследствие того, что вся энергия возбуждения, полученная другими пигментами антенны, передается на молекулы Хл *a* [17]. Спектр флуоресценции зеленого листа располагается в красной области длин волн (660–780 нм) и, как правило, имеют два широких максимума (рис. 5): один на длине волны 680–690 нм (F685), другой – на длине волны 730–740 нм (F740) [17, 18].

Основной вклад в длинноволновый пик спектра вносит реабсорбция длинноволновыми формами хлорофилла флуоресценции, испущенной более коротковолновыми формами [17, 18].

Для количественной оценки формы спектра был использован показатель ω , равный отношению максимальных значений интенсивности флуоресценции в области 730–750 нм и 685 нм ($\omega = F740 / F685$).

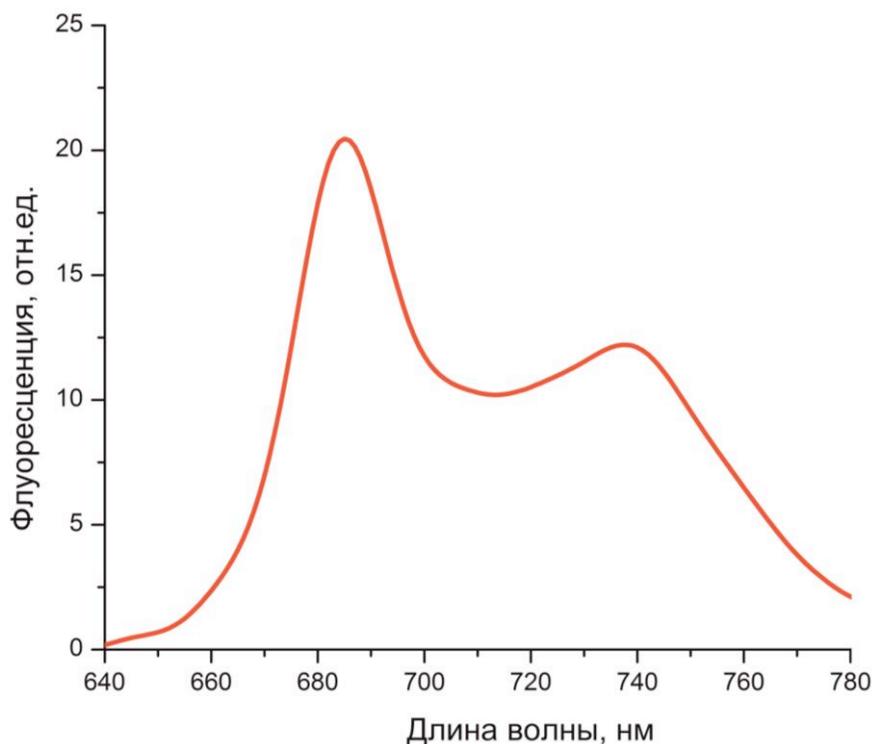


Рисунок 5. Характерный спектр флуоресценции зеленого листа

1.4. Зависимость формы спектров флуоресценции от особенностей изучаемого объекта и условий регистрации

Величина ω зависит от широкого круга биотических и абиотических факторов, таких как: уровень и сбалансированность минерального питания, концентрация CO_2 , интенсивность и длительность освещения, влажность почвы и воздуха. Показано, что на величину ω и относительную скорость прироста биомассы оказывают влияние одни и те же факторы. Данные изменения носят однонаправленный характер, а максимальное значение параметра ω наблюдается при оптимальных условиях развития растения [18].

В работе [18] Асланиди и соавторы рассмотрели влияние большого количества факторов различной природы на форму спектра и величину показателя ω . Основными из них являются:

- **Зависимость параметра ω от концентрации хлорофилла.**

Концентрация хлорофилла оказывает значительное влияние на значение показателя ω . В работе [17] было показано, что при низких значениях содержания хлорофилла флуоресценция на длинах волн 685 и 740 нм возрастает по мере увеличения концентрации хлорофилла *a*. Данный эффект наблюдается как в экстрактах, так и в интактном листе. С увеличением концентрации хлорофилла величина длинноволнового пика флуоресценции меняется незначительно, в то время как коротковолновая красная флуоресценция существенно возрастает, а затем уменьшается из-за реабсорбции испускаемой красной флуоресценции в полосе поглощения хлорофилла. Причиной реабсорбции является перекрытие коротковолновой области спектра флуоресценции хлорофилла с длинноволновой областью его спектра поглощения. Корреляционные связи соотношения максимумов в спектре флуоресценции с содержанием хлорофилла в листе широко обсуждается в литературе [17, 20-22]. Есть данные о высокой положительной корреляции между отношением длинноволнового пика к коротковолновому и содержанием хлорофилла в пересчете на площадь [20,21] и на биомассу [22,23].

- **Зависимость величины ω от длительности освещения листа** может быть весьма значительной. Интенсивность возбуждающего света существенно влияет на кинетики флуоресценции F685 и F740. Однако, если не рассматривать экстремально высокие и низкие интенсивности освещения, то время установления стационарных значений флуоресценции составляет от 3 до 10 мин. Освещение листа приводит к увеличению вклада длинноволновой компоненты флуоресценции в регистрируемый спектр, и значения отношения F740 / F685 увеличивается. При этом наблюдается высокая положительная линейная корреляция между значением ω зафиксированном при достижении пика M кривой МИФ и в стационарном состоянии S [24].

- **Видоспецифичность спектров флуоресценции.** Максимальное значение показателя ω_{\max} является индивидуальной характеристикой для каждого конкретного вида растений, в то время как минимальные значения ω_{\min} слабо зависят от вида и заключены в интервале 0,18–0,25. При этом расположения максимумов в спектре может несколько смещаться в зависимости от вида растения.
- **Влияние гетерогенности органов и тканей.** Значения показателя ω могут значительно отличаться не только для листьев одного и того же растения, но и также для разных участков одного и того же листа.
- **Зависимость величины ω от возраста листа и вегетационного периода** связана со следующими причинами: содержание хлорофилла и светорассеивающие свойства тканей листа с возрастом могут значительно меняться. Зависимость ω от времени вегетации подвержена влиянию фаз жизненного цикла (цветение, колошение) [18].
- **Суточная динамика параметра ω .** Зависимость ω от времени суток близка к суточным кинетикам интенсивности фотосинтеза и важна при анализе измерений *in vivo*.
- **Влияние оптической плотности и светорассеивающих свойств образца.** Спектры флуоресценции интактного листа имеют значительные отличия от спектров гомогенатов тканей растений. Интенсивности F740 и F685 для листьев имеют бóльшие значения, при этом различия в дальней красной области спектра существенно больше, чем в более коротковолновой, что говорит о значительном влиянии реабсорбции излучения в интактном листе на форму спектра флуоресценции [17].

1.5. Метод импульсной флуориметрии

В последние годы метод импульсной флуориметрии стал одной из самых распространенных флуоресцентных методов, применяемых в исследованиях фотосинтеза, а также экологических и агротехнологических исследованиях [25]. Использование РАМ-флуориметра (Pulse Amplitude Modulation fluorometer) дает возможность получить большое количество дополнительной информации о функциональном состоянии фотосинтетического аппарата.

Конструкция РАМ-флуориметра предполагает использование нескольких типов освещения со светом различных длин волн. Возбуждение флуоресценции осуществляется измерительным светом (ИС), который испускается микросекундными вспышками, частоту которых можно изменять в широком диапазоне. На фоне ИС происходит включение и выключение действующего света (ДС), используемого для индуцирования фотосинтетических реакций, а также воздействие кратковременными насыщающими вспышками высокой интенсивности (НВ). Данные вспышки дают возможность разделить вклады фото- и нефотохимического тушения флуоресценции (Рис. 6).

При подаче насыщающей вспышки происходит закрытие всех реакционных центров ФС₂, при этом длительность и интенсивность вспышки не должна приводить к увеличению нефотохимического тушения и долговременным изменениям фотосинтетической активности.

Особенностью и преимуществом устройства импульсного флуориметра является тот факт, что освещение образца действующим светом и подача НВ происходят между импульсами измерительного света. Это позволяет избежать искажения уровня флуоресценции [26]. Стандартный протокол измерений медленных индукционных изменений флуоресценции на РАМ-флуориметре предполагает предварительную темновую адаптацию образца, после чего происходит включение измерительного света и регистрация начального уровня флуоресценции F_0 . Затем подается насыщающая вспышка, при этом флуоресценция возрастает до уровня F_m , в образце в этот момент отсутствует

фото- и нефотохимическое тушение. Интенсивность флуоресценции, вызванной применением НВ, быстро уменьшается до уровня близкого к F_0 , после чего включают ДС. При этом происходит резкое возрастание и последующее более медленное ее снижение флуоресценции. Одновременно с этим подают повторяющиеся насыщающие вспышки. В ответ на каждую вспышку флуоресценция возрастает до уровня F_m' , величина которого оказывается меньше, чем F_m из-за включения механизмов нефотохимического тушения. Уровень флуоресценции, измеряемый непосредственно перед НВ, обозначается F . Уровень F_0' соответствует текущему значению флуоресценции от измерительного света. Величина F_0' может быть измерена путем выключения ДС и освещения образца дальним красным светом сразу после насыщающей вспышки или вычислен автоматически [26].

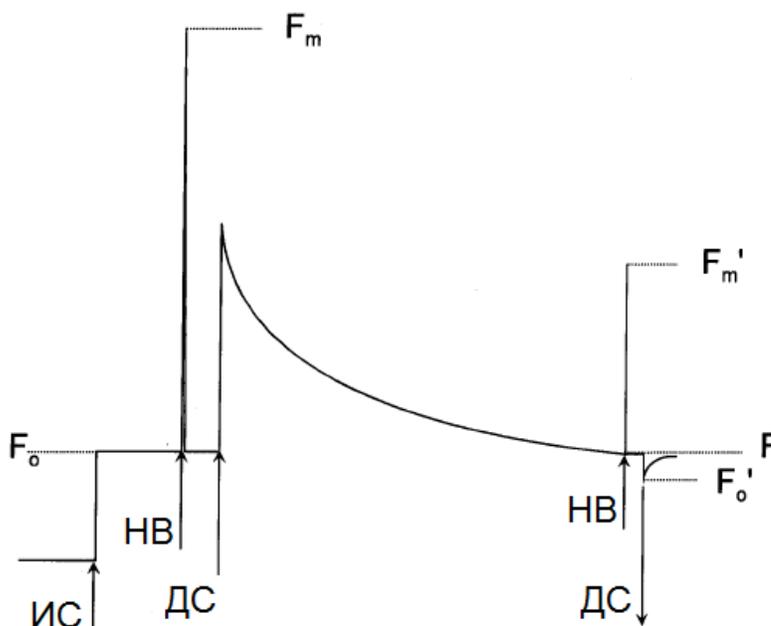


Рисунок 6. Пример кинетики флуоресценции при измерении РАМ-флуориметром: ИС – измерительный свет, ДС – действующий свет, НВ – насыщающая вспышка. Моменты включения измерительного света, включения и выключения действующего света показаны вертикальными стрелками.

Указанные выше значения флуоресценции используются для вычисления показателей, характеризующих функциональное состояние фотосинтетического аппарата [25].

Показатель максимального квантового выхода ФС2 используется для оценки максимальной эффективности ФС2, обозначается F_v / F_m , где $F_v = F_m - F_0$ – переменная флуоресценция, и вычисляется по следующей формуле:

$$F_v / F_m = (F_m - F_0) / F_m. \quad (1)$$

Показатель даёт информацию о потенциальной квантовой эффективности ФС2. Обязательным условием достоверного измерения параметра F_v / F_m является длительная темновая адаптация образца. Для большинства видов растений его величина F_v / F_m составляет около 0,83, при этом уменьшение этого значения может свидетельствовать о стрессовом состоянии растения и частичном повреждении ФС2 [26].

Эффективный квантовый выход фотосистемы 2 (Φ_{PSII}) предложен в работе [27] как параметр, характеризующий долю поглощённой энергии возбуждения, используемой для фотохимических реакций. Данный параметр коррелирует со степенью фотохимического тушения и может быть вычислен по формуле:

$$\Phi_{PSII} = (F_m' - F) / F_m'. \quad (2)$$

Вариабильность Φ_{PSII} находится в пределах от 0 до значения F_v / F_m .

Нефотохимическое тушение флуоресценции может быть оценено с помощью коэффициента нефотохимического тушения, предложенном в работе [28]:

$$NPQ = F_m / F_m' - 1. \quad (3)$$

Для определенного образца он может изменяться в пределах от 0 до ∞ . Важно отметить, что коэффициент NPQ показывает изменения нефотохимического тушения относительно состояния темновой адаптации, поэтому недостаточное время темновой адаптации может привести к заниженным значениям этих параметров.

2. Объекты и методика экспериментов

2.1. Объекты исследования

При измерении флуоресцентных характеристик в процессе осенней деградации хлорофилла использовали листья рябины *Sorbus aucuparia* 'Pendula', произрастающей на территории Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова. Листья находились на разной стадии деградации хлорофилла и имели окраску от ярко-зеленой до полностью желтой (рис. 7). Измерения проводили в сентябре-октябре 2017 г.

Также был проведён весенний этап измерений флуоресцентных показателей листьев на стадии развертки листа на побеге и последующего роста, для этого были использованы молодые листья тех же рябин. Образцы имели размер от 4 до 12 см в длину и отличались окраской (цвет в зависимости от степени зрелости листа изменялся от салатного до насыщенного зелёного). Весенний этап измерений был проведён в мае 2018 г.



Рисунок 7. Образцы листьев рябины *Sorbus aucuparia* 'Pendula'

Вторая часть работы была выполнена на проростках бобов *Vicia faba* L. (сорт «Русские черные») (рис 8.) Растения выращивали в пакетах объемом 0,5 л.

В экспериментах были использованы листья 2 яруса двухнедельных проростков. Семена перед посадкой предварительно замачивали в теплой воде в течение 3 часов.

Для опытов с различными режимами освещения образцы на 8 день после посадки разделяли на 3 группы и выращивали далее при разной освещенности. Контрольную группу выращивали под лампой УСС 60 Магистраль Ш, расположенной на высоте 30 см от ростков исоздающей освещенность около 8000 лк, вторая группа находилась на расстоянии 2 м от окна в отсутствии прямых солнечных лучей под освещением примерно 200 лк, третья группа была размещена в условиях сильного затенения, освещенность составляла порядка 10 лк. Измерения показателей проводили через 7 дней после деления (сформировано три яруса листьев). После чего помещали все растения под мощную лампу и проводили повторные измерения через двое суток.



Рисунок 8. Образцы семян и проростков бобов *Vicia faba L*

2.2. Регистрация спектров флуоресценции

Спектры флуоресценции листьев растений измеряли на спектрофлуориметре Solar CM2203 (Рис. 9). Лист освещали в течение 70 с светом с длиной волны $\lambda_{\text{макс}} = 450$ нм, $\Delta\lambda = 5$ нм, для стандартизации условий эксперимента, затем выдерживали в темноте в течение 5 мин, после чего включали свет с той же длиной волны и регистрировали спектр в диапазоне 630–800 нм после 15 минут освещения.

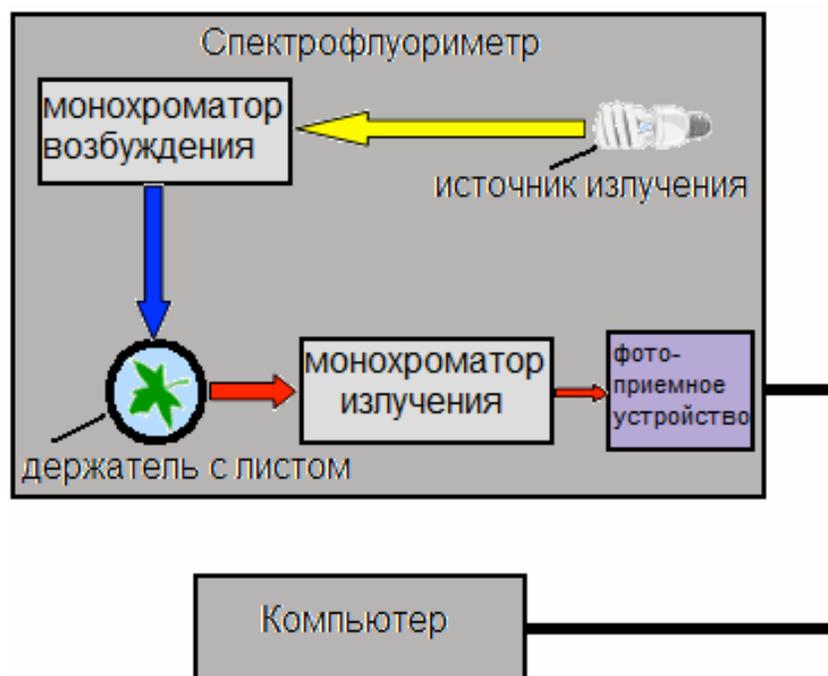


Рисунок 9. Схема установки для измерения спектров флуоресценции

Для количественной оценки формы спектра использовали параметр $\omega = F740 / F685$, где $F685$ и $F740$ – интенсивности флуоресценции на длинах волн 685 и 740 нм соответственно.

2.3. Измерение индукционных изменений флуоресценции хлорофилла методом импульсной флуориметрии

Измерения индукционных изменений флуоресценции проводили при

помощи импульсного флуориметра РАМ-2500 (Walz, Германия). На рис. 10 представлена характерная кривая, полученная при использовании стандартного протокола измерений.

Лист помещали в измерительную камеру и адаптировали к темноте в течение 5 минут. Затем включали слабый измерительный свет ($\lambda = 630$ нм, $\Phi AP \approx \text{мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$), далее для определения максимального квантового выхода флуоресценции F_V / F_m подавали насыщающую вспышку. После короткого периода релаксации (30 с) включали синий действующий свет ($\lambda = 455$ нм, $\Phi AP \approx 150 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$), и на его фоне происходила подача кратковременных насыщающих вспышек ($\Delta t = 0,5$ с, $\lambda = 630$ нм, $\Phi AP \approx 3500 \text{ мкЭ м}^{-2}\text{с}^{-1}$).

Используя значения интенсивности флуоресценции, полученные при воздействии измерительного и действующего света, а также насыщающих вспышек, программное обеспечение прибора производило автоматическое вычисление флуоресцентных параметров F_V / F_m , $\Phi PSII$ и NPQ .

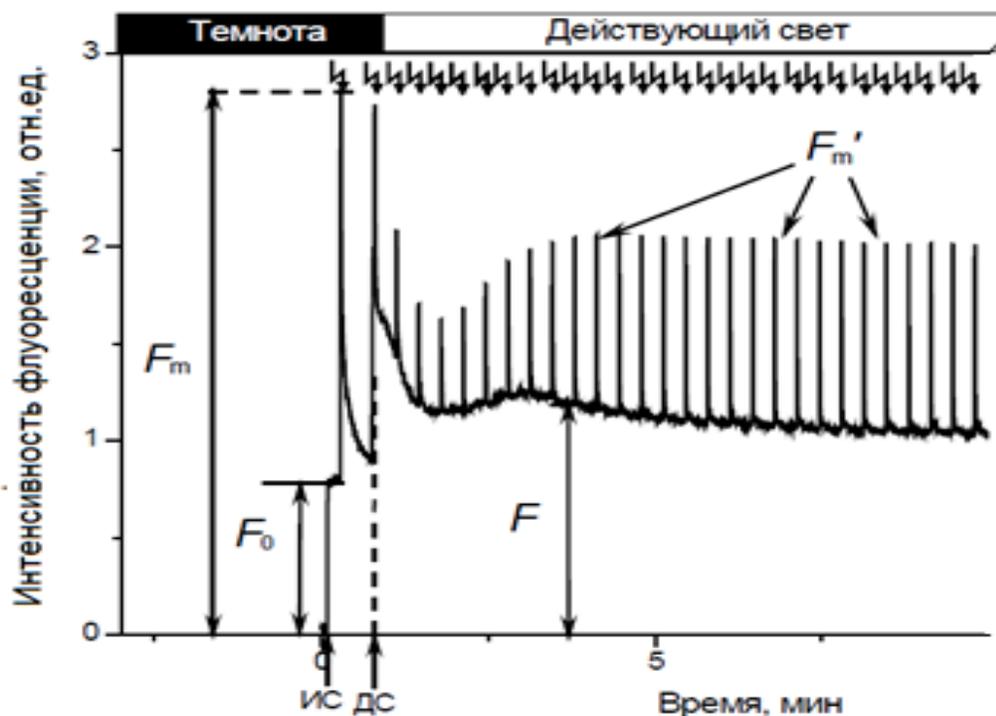


Рисунок 10. Характерная кривая флуоресценции листьев растений, измеренная с помощью импульсного флуориметра РАМ-2500: ИС – измерительный свет,

ДС – действующий свет, зигзагообразные стрелки – насыщающие вспышки.

2.4. Определение содержания хлорофилла в листьях растений.

Общее содержание хлорофиллов а и б определялось спектрофотометрическим методом. Для измерения спектров поглощения растворов хлорофилла использовали спектрофотометр SolarPV1251. Значения оптической плотности на длинах волн 645 и 662 нм использовали для вычисления концентрации хлорофиллов по следующим формулам:

$$C_a \text{ (мг/л)} = 11,24 \cdot D_{662} - 2,04 \cdot D_{645},$$

$$C_b \text{ (мг/л)} = 20,13 \cdot D_{645} - 4,19 \cdot D_{662},$$

где C – концентрация хлорофилла в растворе, D_{645} и D_{662} – соответствующие оптические плотности на длинах волн 645 и 662 нм [29].

Затем, используя данные о массе листа, полученные результаты приводили к значениям содержания хлорофилла в мг на 1 г сырого листа.

3. Результаты и обсуждения.

3.1. Опыты с листьями рябины в условии осенней деградации хлорофилла и весеннего роста

Содержание хлорофилла и других вспомогательных пигментов в листьях рябины предсказуемо снижалось в течение всего осеннего периода измерений. При уменьшении содержания хлорофилла в листе рябины наблюдались снижение как максимальных, так и стационарных значений интенсивности флуоресценции (рис. 11, *а*). Было отмечено также снижение стационарных значений эффективного квантового выхода и нефотохимического тушения (рис. 11, *б*). Подобные изменения стационарных значений коэффициентов Φ_{PSII} и NPQ были отмечены в работе [30]. Резкое возрастание нефотохимического тушения в первые минуты после включения действующего света может свидетельствовать об образовании градиента протонов на мембране тилакоидов, а дальнейшее снижение показателя NPQ о частичном снятии ΔpH при активации работы АТФ-синтазы [31].

Особенность весенних измерений флуоресцентных характеристик и содержания хлорофилла в листе заключалась в невозможности достижения критически низких значений содержания хлорофилла в листе. Несмотря на это ограничение были получены интересные результаты. Стоит отметить, что величина максимальных и стационарных значений флуоресценции изменялась незначительно (рис. 12, *а*), при этом наблюдалось существенное увеличение значений F_m' по мере роста молодого листа. Также для зрелых листьев скорость тушения флуоресценции в первые минуты освещения были выше. Все это нашло отражение в форме кинетик показателей Φ_{PSII} и NPQ (рис. 12, *б*). Стационарные значения Φ_{PSII} повышались с увеличением возраста листа и содержания хлорофилла в нем постепенно достигая значений, характерных для

здорового зрелого листа (выше 0,6). Стационарное значение нефотохимического тушения снижалось. При этом для листьев, эксперименты с которыми были проведены 10 мая, было отмечено изменение формы кинетики NPQ по сравнению с более молодыми образцами. Кинетики нефотохимического тушения, зарегистрированные 4 и 7 мая, имели слабо выраженное снижение значений NPQ после нескольких минут освещения, наблюдаемое нами в осенней серии. Это может свидетельствовать о неполном формировании фотосинтетического аппарата молодых листьев, в частности несогласованной работе или низкой активности цикла Кальвина – Бенсона или АТФ-синтазы.

Спектры флуоресценции, регистрируемые после 15 минут освещения образца, для осенней и весенней серий представлены на рисунке 13. Для осенней серии по мере изменения в окраске листьев от ярко-зеленой до желтой (рис.13, *а*) наблюдались изменения в соотношении пиков, так что отношение F740 / F685 постепенно уменьшалось. Снижение интенсивности длинноволнового пика в спектре и превращение его в плечо говорит о достижении экстремально низких значений содержания хлорофилла об уменьшении эффекта реабсорбции при уменьшении концентрации хлорофилла в тканях листа. В случае весенней серии наблюдался схожий эффект (рис.13, *б*): по мере роста листа и увеличения концентрации хлорофилла в тканях происходило «разгорание» длинноволновой полосы флуоресценции, т.е. повышения степени реабсорбции длинноволновыми формами хлорофилла флуоресценции, испущенной коротковолновыми формами.

Несмотря на глобальные различия биологических процессов, происходящих в тканях листов период осенней дегградации хлорофилла и весеннего роста после развертывания листа на побеге можно отметить общий «рисунок» изменений, которые претерпевает форма спектра флуоресценции при этих условиях. Это свидетельствует о возможности рассмотрения содержание хлорофилла в листе в качестве самого существенного фактора, влияющего на

соотношение пиков в стационарном спектре флуоресценции.

Также нами были построены зависимости флуоресцентных показателей от содержания хлорофилла $\omega = F740 / F685$ и Fv / Fm . Зависимости для осенней серии показаны на рис. 14. Максимальный квантовый выход флуоресценции остается на уровне значений, характерных для здоровых листьев, при снижении содержания хлорофилла более чем в два раза, а затем резко уменьшается (рис.14, *a*). Это может указывать на длительное сохранение высокой фотохимической активности фотосистемы 2 в процессе отмирания листа. Значение омега показывает более плавное уменьшение при снижении содержания хлорофилла в листе.

Как обсуждалось ранее существуют литературные данные [20-23] свидетельствующие о высокой положительной линейной корреляции между отношением длинноволнового и коротковолнового максимума. В некоторых работах используется обратное отношение (коротковолнового пика спектра к длинноволновому), но пересчет данных демонстрирует хорошее совпадение результатов. В наших экспериментах был получен достаточно большой разброс точек, который может быть объяснен различной скоростью разрушения пигмент-белковых комплексов фотосинтетического аппарата (рис.14, *б*). При этом общая тенденция постепенного монотонного снижения значений показателя ω при уменьшении концентрации хлорофилла в листе сохранялась. В работе [30], посвященной исследованию флуоресцентных параметров импульсной флуориметрии древесных видов растений, также был зафиксирован сильный разброс точек, подчиняющихся определённой тенденции.

Аналогичные зависимости $\omega = F740 / F685$ и Fv / Fm от содержания хлорофилла были построены для весенней серии (рис. 15). Для сопоставления результатов с данными осенней серии по оси ординат был выбран тот же масштаб. Наблюдалось слабое увеличение значений показателя ω (рис.15, *a*) и отсутствие зависимости максимального квантового выхода от содержания

хлорофилла. При этом содержание хлорофилла изменялось в пределах 1,2-2,6 мг на 1 г сырой массы листа, в то время как для осенней деградации содержание хлорофилла имело диапазон изменений от 0 до 2,5 мг на 1 г сырой массы листа. Таким образом, можно говорить о слабой чувствительности параметра F_v / F_m к содержанию хлорофилла в листе в области больших концентраций. Лист сразу после разворачивания на побеге имеет высокую фотохимическую активность фотосистемы 2 и способен к эффективному фотосинтезу. В тоже время показатель ω демонстрирует тенденцию к параллельным изменениям вместе с содержанием хлорофилла.

Стационарный уровень нефотохимического тушения при увеличении содержания хлорофилла и степени зрелости листа уменьшается (рис.16). Данный эффект, по-видимому, связан с адаптацией только развернувшегося листа к высокой интенсивности солнечного излучения. Высокий уровень нефотохимического тушения является нормальной реакцией фотосинтетического аппарата на световой стресс. При длительной адаптации растения к сильной интенсивности излучения значения NPQ в ответ на ДС оказываются ниже, чем для аналогичных образцов выращенных в нормальных условиях освещенности, что связано с усилением фотозащитных механизмов [32].

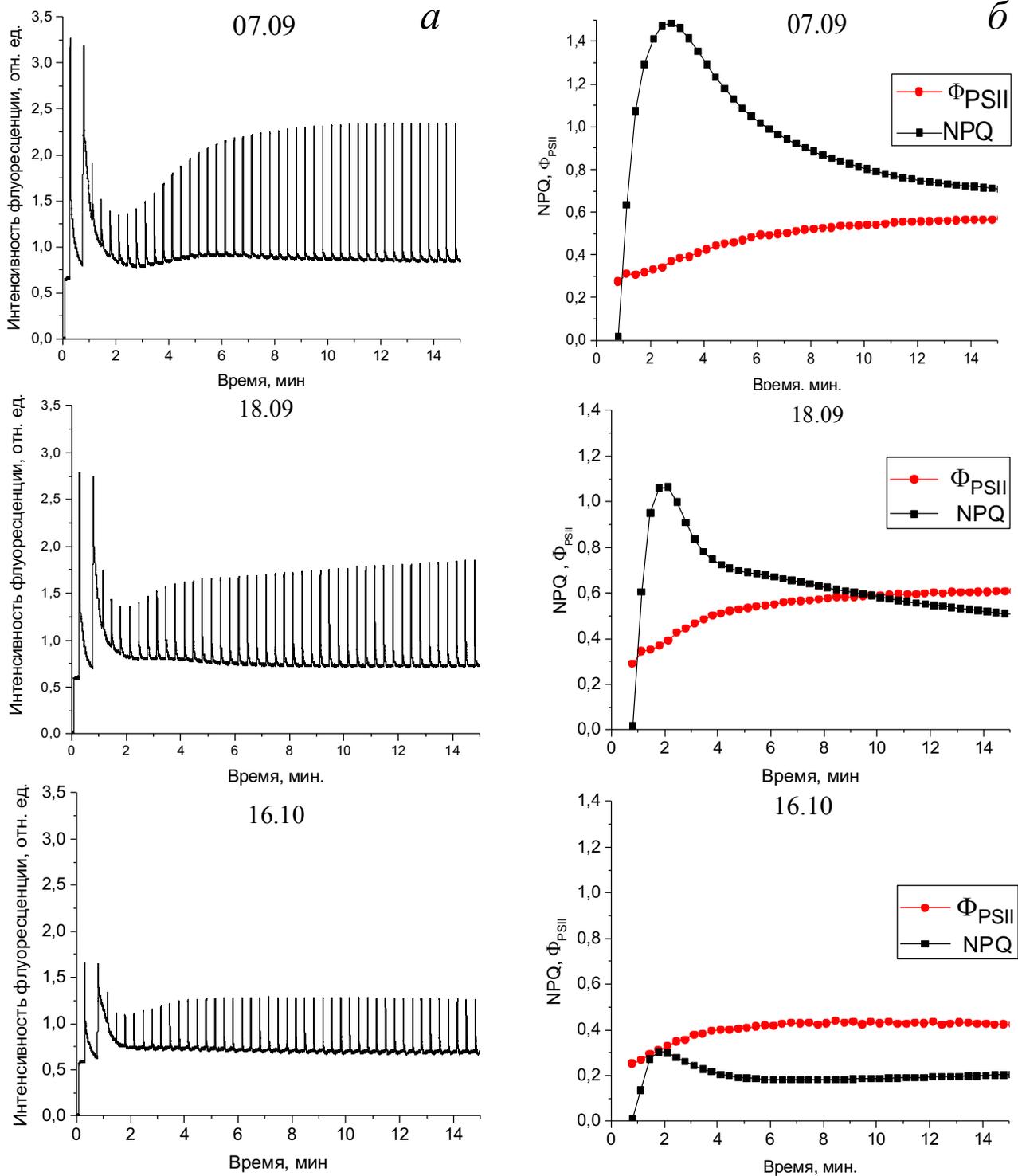


Рисунок 11. Характерные кинетики флуоресценции (а) и коэффициентов эффективного квантового выхода и нефотохимического тушения (б) листьев рябины от 7.09 до 16.10.

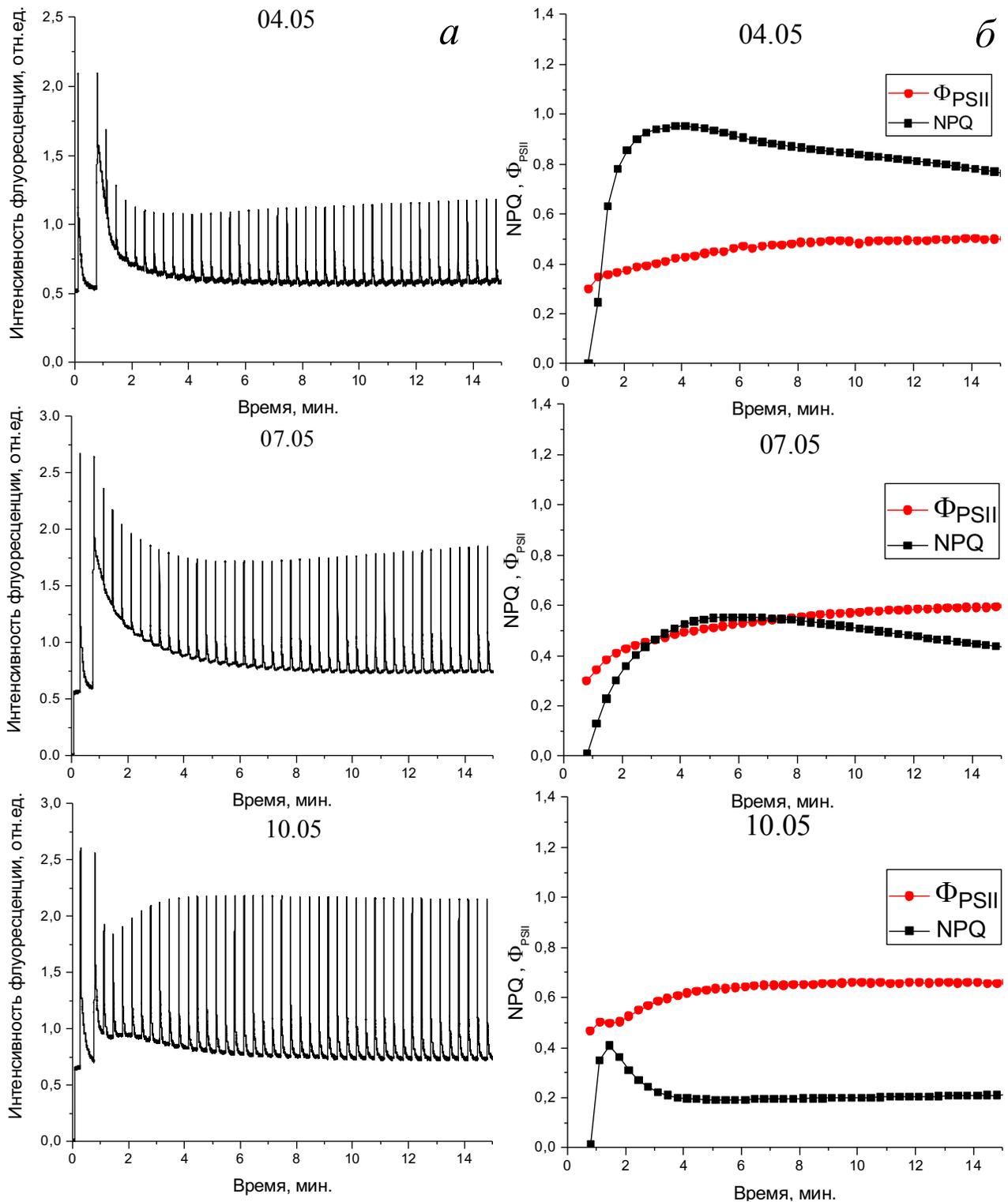


Рисунок 12. Характерные кинетики флуоресценции (а) и коэффициентов эффективного квантового выхода и нефотохимического тушения (б) листьев рябины от 4.05 до 10.05.

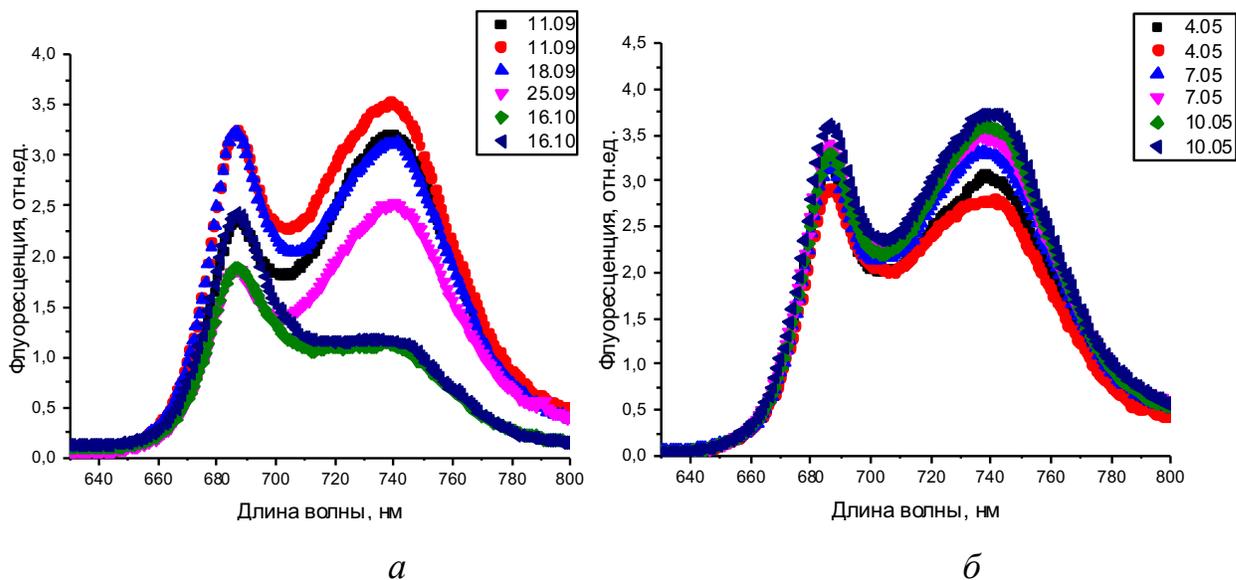


Рисунок 13. Характерные спектры флуоресценции листьев рябины в условиях осенней деградации (а) и на стадии весеннего роста (б) после 15 минут освещения.

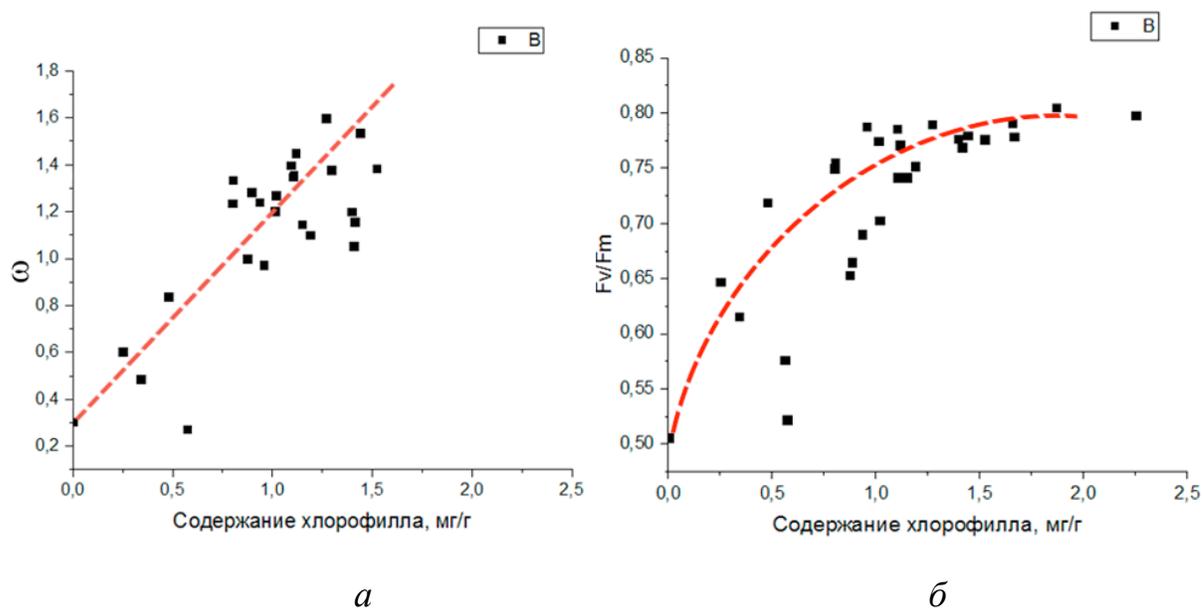
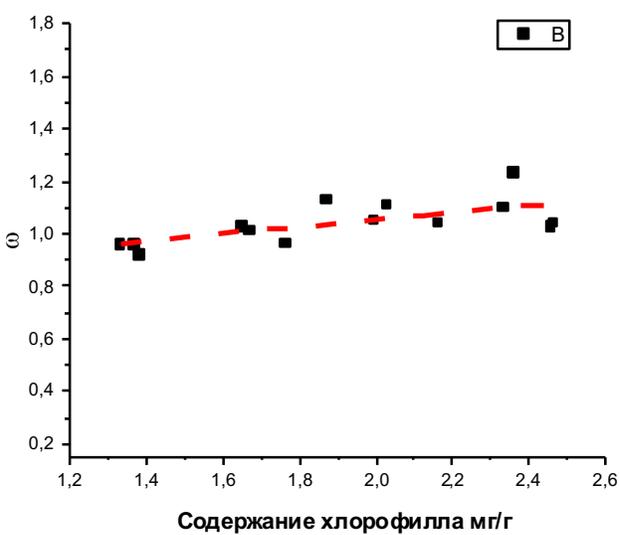
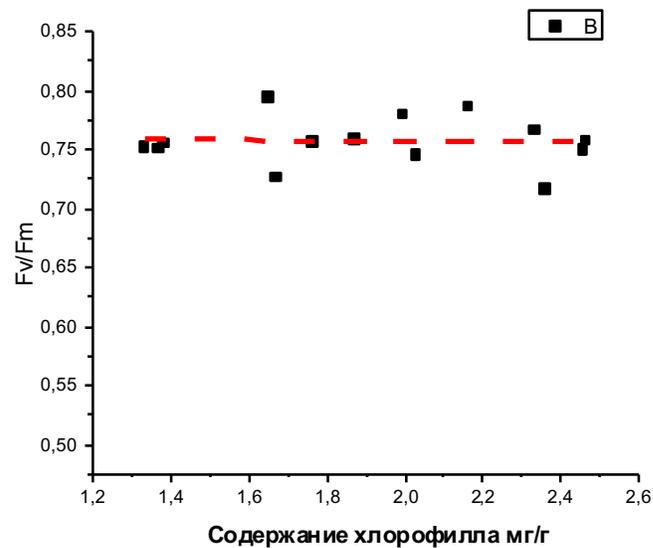


Рисунок 14. Зависимость коэффициентов $\omega = F740 / F685$ (а) и F_v / F_m (б) от содержания хлорофилла в листьях рябины при осенней деградации хлорофилла.



а



б

Рисунок 15. Зависимость коэффициентов $\omega = F740 / F685$ (а) и Fv / Fm (б) от содержания хлорофилла в молодых листьях рябины на стадии весеннего роста.

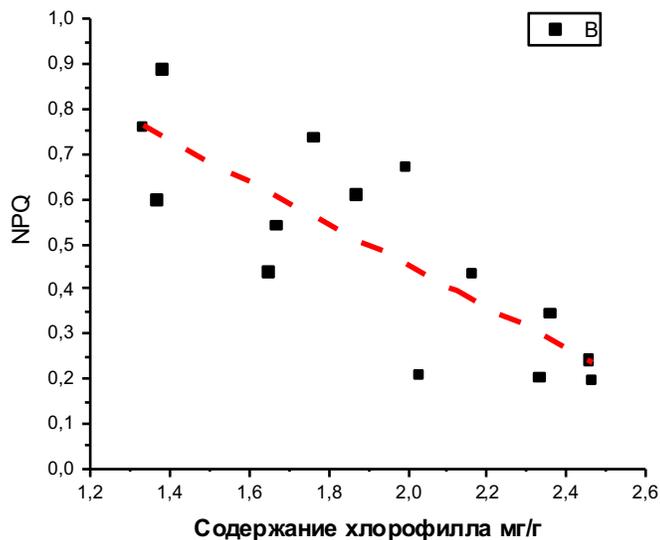


Рисунок 16. Зависимость коэффициента нефотохимического тушения NPQ от содержания хлорофилла в молодых листьях рябины на стадии весеннего роста.

3.2. Эксперименты по выращиванию растений в различных условиях освещенности

Снижение интенсивности освещения при выращивании приводило к уменьшению значений отношения $F740 / F685$ и содержания хлорофилла в листьях. Однако, при помещении растений в условия высокого уровня освещенности происходит постепенное увеличение значений обоих показателей, что свидетельствует об улучшении физиологического состояния растений. Также наблюдалось быстрое увеличение площади листьев для проростков варианта низкой освещенности, до размещения под лампой имевших узкие вытянутые и бледные листья.

Данный эффект показывает большие возможности растительных организмов к восстановлению эффективной работы фотосинтетического аппарата. И ещё раз демонстрирует взаимосвязь величины содержания хлорофилла и параметра $F740 / F685$.

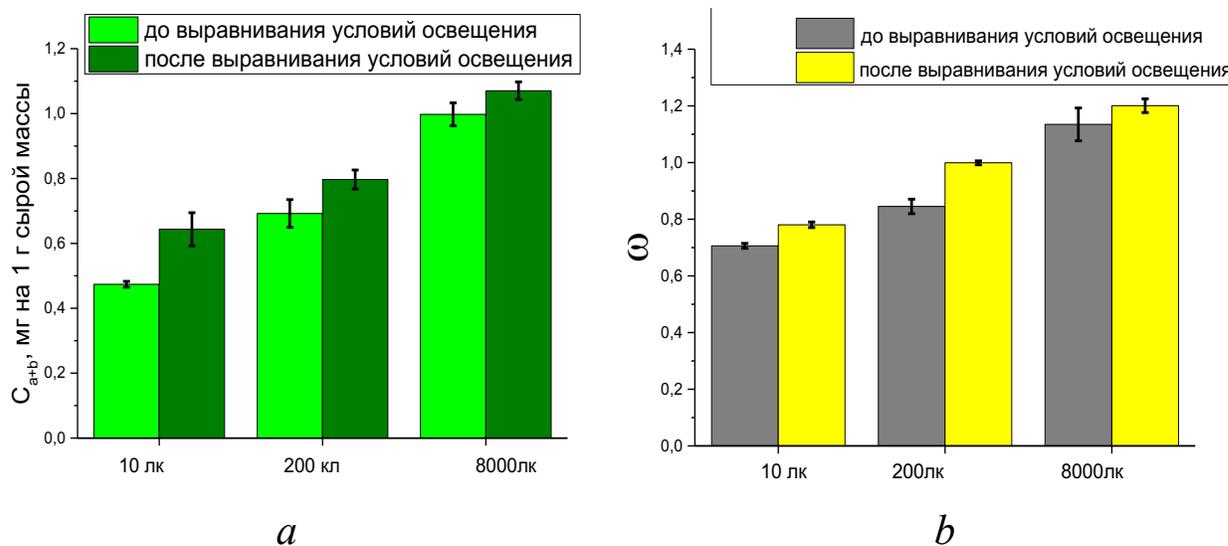


Рисунок 17. Средние значения содержания хлорофилла (а) и показателя $\omega = F740 / F685$ (b) для листьев проростков бобов, выращенных в различных условиях освещенности

Основные результаты и выводы

1. Исследованы спектры флуоресценции листьев бобов, выращенных при пониженной освещенности, и листьев рябины в условиях осенней деградации хлорофилла и весеннего роста. Во всех проведенных экспериментах установлена положительная корреляция между стационарным значением $\omega = F740 / F685$ (в конце индукционного периода) и содержанием хлорофилла в листьях растений, что свидетельствует о ее универсальном характере.

2. Установлено снижение максимального (Fv / Fm) и эффективного (Φ_{PSII}) квантового выхода фотосистемы 2, а также нефотохимического (NPQ) тушения флуоресценции в условиях осенней деградации хлорофилла в листьях рябины. Предполагается, что это связано с нарушениями в работе фотосинтетического аппарата отмирающего листа.

3. Максимальный квантовый выход (Fv / Fm) фотосистемы 2 листьев рябины в процессе весеннего роста оставался практически неизменным, в то время как стационарный уровень нефотохимического тушения (NPQ) существенно уменьшался. Это свидетельствует о высокой фотохимической активности ФС2, но недостаточном уровне адаптации фотосинтетического аппарата к высокой интенсивности излучения у молодых листьев сразу после развертывания на побеге.

4. Установлена высокая «чувствительность» показателя $\omega = F740 / F685$ к содержанию хлорофилла в листе, в то время как параметр (Fv / Fm) уменьшался только при сильном понижении содержания хлорофилла в листе.

5. Воздействие света высокой интенсивности на растения бобов, выращенных при пониженной освещенности, приводило к увеличению содержания хлорофилла и соответствующему увеличению параметра $\omega = F740 / F685$, что указывает на высокие адаптационные возможности фотосинтетического аппарата.

Список литературы

1. Нобел П. Физиология растительной клетки. (Физико-химический подход). М.: Мир, 1973. 288 с.
2. Тихонов А.Н. Регуляция световых и темновых стадий фотосинтеза // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 11. – С. 8–15.
3. Тихонов А.Н. Трансформация энергии в хлоропластах – энергопреобразующих оргanelлах растительной клетки // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 4. – С. 24–32.
4. Рубин А.Б., Шинкарёв В.П. Транспорт электронов в биологических системах. М.: Наука, 1984. 320 с.
5. Peter G.F., Thornber G.P. Biochemical composition and organization of higher plant photosystem 2 light-harvesting pigment proteins // J. Biol. Chem. – 1991. – V. 266. – P. 16745–16754.
6. Vermaas W. Molecular-biological approaches to analyze photosystem 2 structure and function // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1993. – V. 44. – P. 457–481.
7. Полякова И.Б. Медленная индукция флуоресценции листьев растений при разной фотосинтетической активности: Дисс. ... канд. физ.-мат. наук. М.: МГУ, 2002. 146 с.
8. Kyle D.J., Staehelin L.A., Arntzen C.J. Lateral mobility of the light-harvesting complex in chloroplast membranes controls excitation energy distribution in higher plants // Arch. Biochim. Biophys. – 1983. – V. 222. – P. 527–541.
9. Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф. и др. Физиология растений. М.: Издательский центр Академия, 2005. 640 с.
10. Клейтон Р. Фотосинтез. Физические механизмы и химические модели. М.: Мир, 1984. 352 с.
11. Твердислов В.А., Тихонов А.Н., Яковенко Л.В. Физические механизмы функционирования биологических мембран. М.: Изд-во Моск.

- университета, 1987. 200 с.
12. Lazar D. Chlorophyll a fluorescence induction // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1999. –V. 1412.– P. 1–28.
 13. Krause G.H., Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.*– 1991.– V. 42.– P. 313–349.
 14. Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis. Papageorgiou G.C., Govindjee (eds) / Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2004.
 15. Караваев В.А. Нелинейные регуляторные процессы в фотосинтезе высших растений Дисс. ... докт. физ.-мат. наук. М.: МГУ, 1990. 416 с.
 16. Вацадзе Н.С., Пахненко Е.П., Глазунова С.А., Караваев В.А., Байков А.А., Солнцев М.К. Люминесцентные показатели растений на ранних этапах онтогенеза при разных условиях питания // *АгроЭкоИнфо.* – 2011. – №2.– 13 с.
 17. Buschmann C. Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves // *Photosynth. Res.* 2007. V. 92. P. 261-271.
 18. Асланиди К.Б., Шалапенко А.А., Карнаухов В.Н., Берестовская Н.Г., Шавкин В.И. Метод определения функционального состояния растений по спектрам флуоресценции хлорофилла (техника биомониторинга). Пушино: НЦБИ АН СССР. 1988.
 19. D'Ambrosio N., Szabo K., Lichtenthaler H.K. Increase of the chlorophyll fluorescence ratio F690/F735 during the autumnal chlorophyll breakdown // *Radiat. Environ. Biophys.* –1992.– V. 31. –P. 51–62.
 20. Lichtenthaler H.K., Buschmann C., Rinderle U., Schmuck G. Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology // *Radiat. Environ. Biophys.* –1986. –V. 25 –P. 297–308.
 21. Gitelson A.A., Buschmann C., Lichtenthaler H.K. The chlorophyll fluorescence ratio F735 / F700 as an accurate measure of the chlorophyll content in plants

- //Remote Sensing of Environment. 1999. V. 69.P. 296–302.
- 22.Калмацкая О.А., Левыкина И.П., Пацаева С.В., Караваев В.А., Южаков В.И.Флуоресценция листьев бобов, выращенных при пониженной освещенности //Вестник Московского университета. Серия 3. Физика. Астрономия.–2013. –№ 6.–С. 31–34.
- 23.Kalmatskaya O.A., Karavaev V.A., Gunar L.E. Fluorescent indices of oak and wheat leaves in dependence on chlorophyll content // Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering. –2016.– V. 9917.– P. 99170O-1–99170O-6.
- 24.Lichtenthaler H.K., Hak R., Rinderle U. The chlorophyll fluorescence ratio F690/F730 in leaves of different chlorophyll content // Photosynthesis Research. –1990.–V. 25.– P. 295–298.
- 25.Maxwell K., Johnson G.N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide // J. Exp. Botany. – 2000. – V. 51. – P. 659–668.
26. Schreiber U. Pulse-Amplitude (PAM) fluorometry and saturation pulse method // In: Papageorgiou G and Govindjee (eds) Chlorophyll fluorescence: A signature of Photosynthesis. 2004. P.279-319. Springer, Dordrecht,the Netherlands.
- 27.Genty B., Briantais J.-M., Baker N.R. The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. –V. 990.– P. 87–92.
- 28.Bilger W., Björkman O. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in *Hederacanariensis* // Photosynth. Res. – 1990.– V. 25. – P. 173–185.
- 29.Lichtenthaler H.K., Buschmann C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy // Curr. Protoc. Food Analyt. Chem. – 2001. – F4.3.1–F4.3.8.

30. Ptushenko V.V., Ptushenko O.S., Tikhonov A.N. Chlorophyll fluorescence induction, chlorophyll content, and chromaticity characteristics of leaves as indicators of photosynthetic apparatus senescence in arboreous plants // *Biochemistry (Moscow)*. – 2014. – V. 79. – I. 3. – P. 260 – 272.
31. Schreiber U., Klughammer C. Non-photochemical fluorescence quenching and quantum yields in PSI and PSII: Analysis of heat-induced limitations using Maxi-Imaging-PAM and Dual-PAM-100 // *PAM Application Notes*. – 2008. – V. 1. – P. 15–18.
32. Mishanin V. I., Trubitsin B.V., Benkov M.A., Minin A.A., Tikhonov A.N. Light acclimation of shade-tolerant and light-resistant *Tradescantia* species: induction of chlorophyll *a* fluorescence and P700 photooxidation, expression of PsbS and Lhcb1 proteins // *Photosynth. Res.* – 2016. – V. 130. – P. 275-291.

Хочу поблагодарить моего научного руководителя Каравая Владимира Александровича за знания, веру в меня и за огромное терпение в нашей работе. Также выражаю огромную благодарность Калмацкой Олеся Алексеевне за многочисленную помощь, терпение и консультации. Я благодарю Пацаеву Светлану Викторовну за возможность использования научным оборудованием, а также за внимание к моей работе. Выражаю признательность Салецкому Александру Михайловичу за знания, которые получила во время обучения. Спасибо моей семье и друзьям за поддержку на всем пути.