

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени М.В.ЛОМОНОСОВА»

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ

КАФЕДРА ОБЩЕЙ ФИЗИКИ

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

студентки 6 курса

Калмацкой Олеси Алексеевны

**Спектры флуоресценции листьев растений, обработанных  
физиологически активными веществами**

Научный руководитель:

д.ф-м.н., проф. В.А. Караваев

---

Допущена к защите

«25» декабря 2012 г.

Заведующий кафедрой общей физики

д.ф-м.н., проф. А.М. Салецкий

---

Москва, 2012

## Содержание

1.	Введение .....	3
2.	Обзор литературы .....	4
2.1.	Структурно-функциональная организация.....	4
	фотосинтетического аппарата высших растений .....	4
2.2.	Медленная индукция флуоресценции фотосинтезирующих объектов .....	7
2.3.	Спектры флуоресценции листьев растений.....	9
2.4.	Зависимость формы спектров флуоресценции от особенностей изучаемого объекта и условий регистрации .....	10
2.5.	Методика коррекции спектров с учетом медленной индукции флуоресценции листьев растений .....	13
3.	Объекты и методика экспериментов .....	16
3.1.	Объекты исследования.....	16
3.2.	Методика обработки образцов .....	16
3.3.	Регистрация спектров флуоресценции.....	20
3.4.	Регистрация медленной индукции флуоресценции на длинах волн 685 и 740 нм .....	21
3.5.	Измерение содержания хлорофилла в листьях .....	21
3.6.	Измерение интенсивности освещения .....	22
3.7.	Корректировка интенсивностей пиков спектров флуоресценции .....	22
4.	Результаты и обсуждение.....	23
4.1.	Опыты с физиологически активными веществами с известным избирательным действием на фотосинтетический аппарат .....	23
4.2.	Опыты с хлоридом кадмия .....	26
4.3.	Опыты с гербицидами и стимуляторами роста.....	26
4.4.	Эксперименты по выращиванию растений в различных условиях освещенности.....	29
5.	Результаты и выводы .....	36
6.	Список литературы.....	38

# 1. Введение

Развитие жизни на Земле во многом определяется присутствием на нашей планете растений. Они поддерживают уровень кислорода в атмосфере и превращают неорганические вещества в органические, способствуя тем самым эволюции. Человечеству растения служат продуктами питания, сырьем для строительства и промышленности, основой многих лекарственных препаратов. Однако развитие цивилизации сопровождается увеличением влияния антропогенного фактора на окружающую нас природную среду и экологическую обстановку. В этих условиях важными задачами являются более детальное изучение структурно-функциональной организации фотосинтетического аппарата растений, а также усовершенствование техники биомониторинга. Один из методов определения физиологического состояния растений связан с регистрацией спектров флуоресценции зеленого листа.

В данной работе приведены результаты исследований спектров флуоресценции листьев растений в зависимости от условий, в которых было выращено растение, а также способов и доз обработки растений физиологически активными веществами. При постановке и решении этих задач были учтены следующие обстоятельства.

1. На сегодняшний день механизмы возникновения пиков в спектрах флуоресценции фотосинтезирующих объектов остаются до конца не выясненными. Поэтому представляется важным исследовать эти спектры в условиях обработки растений физиологически активными веществами с известным избирательным действием на фотосинтетический аппарат.

2. Из литературы известно, что форма спектров флуоресценции существенно зависит от условий выращивания растений и, в частности, от содержания в листьях хлорофилла. В этой связи представляет интерес изучение спектров флуоресценции растений, выращенных при разной освещенности.

3. Современная агропромышленная индустрия предлагает множество различных подкормок, удобрений, фунгицидов, гербицидов и проч. При этом во многих случаях остается невыясненным влияние используемых физиологически активных веществ на первичные процессы фотосинтеза. С помощью спектров флуоресценции предполагалось изучить изменения в фотосинтетическом аппарате растений при их обработке гербицидами (препарат чистолан) и стимуляторами роста (препараты эпин-экстра, феровит, силиплант).

Результаты работы частично изложены в материалах международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2011».

## 2. Обзор литературы

Фотосинтез представляет собой многоступенчатую реакцию преобразования солнечной энергии в химическую энергию органических соединений [1]. Основными частями этого процесса являются световая и темновая стадии [2].

Световой стадией фотосинтеза называют совокупность процессов, в результате которых за счет энергии света синтезируются молекулы аденазинтрифосфорной кислоты (АТФ) и восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН). Темновая стадия – это совокупность биохимических реакций, в результате которых происходит усвоение растением атмосферной углекислоты ( $\text{CO}_2$ ) и образование углеводов [3].

### 2.1. Структурно-функциональная организация фотосинтетического аппарата высших растений

У высших растений процессы фотосинтеза протекают в хлоропластах – специализированных энергопреобразующих органеллах растительной клетки (рис. 1). Под двойной оболочкой хлоропласта, состоящей из наружной и внутренней мембран, находятся протяженные мембранные структуры, которые образуют замкнутые пузырьки, называемые тилакоидами [2]. Внутри одного хлоропласта содержится обычно около 1000 тилакоидов [4]. Различают тилакоиды гран (граны – стопки тилакоидов) и тилакоиды стромы, выходящие за пределы гран и являющиеся продолжением тилакоидов гран. На один тилакоидный диск приходится в среднем 200 цепей электронного транспорта (ЦЭТ) и порядка  $10^5$  молекул пигментов. К пигментам, содержащимся в хлоропластах, относятся хлорофилл *a* (Хл *a*), хлорофилл *b* (Хл *b*), а также каротиноиды.

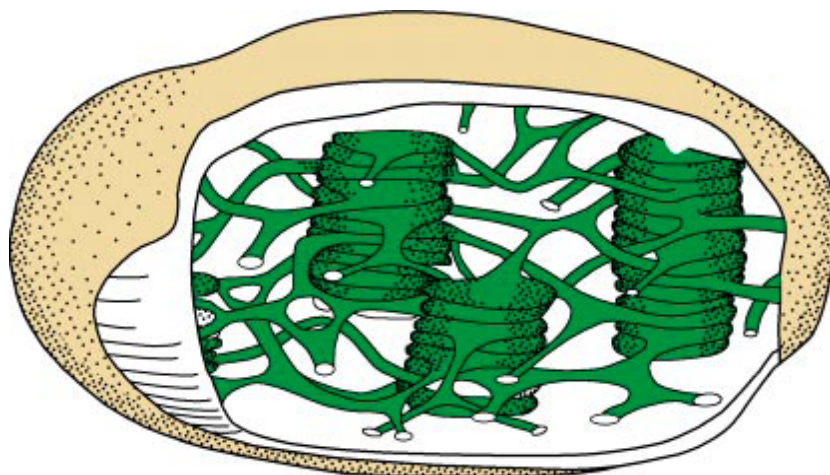


Рис. 1. Строение хлоропласта [2].

Схема фотосинтетического аппарата представлена на рис. 2. Перенос электрона от  $\text{H}_2\text{O}$  к  $\text{НАДФ}^+$  с поглощением двух квантов света осуществляется двумя фотосистемами (ФС), различающимися по составу белков, пигментов и оптическим свойствам. Каждая фотосистема состоит из светособирающей пигментной матрицы, реакционного центра (РЦ), представляющего собой димер хлорофилла, нескольких переносчиков электронов белковой и небелковой природы. Комплексы ФС2 в основном локализованы в тилакоидах гран, а комплексы ФС1 располагаются в тилакоидах стромы [5].

Светособирающая антенна ФС1 поглощает свет с длиной волны  $\lambda < 700 \div 730$  нм, а ФС2 – свет с  $\lambda < 680 \div 700$  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  $\text{P}_{700}$  и  $\text{P}_{680}$  [2].

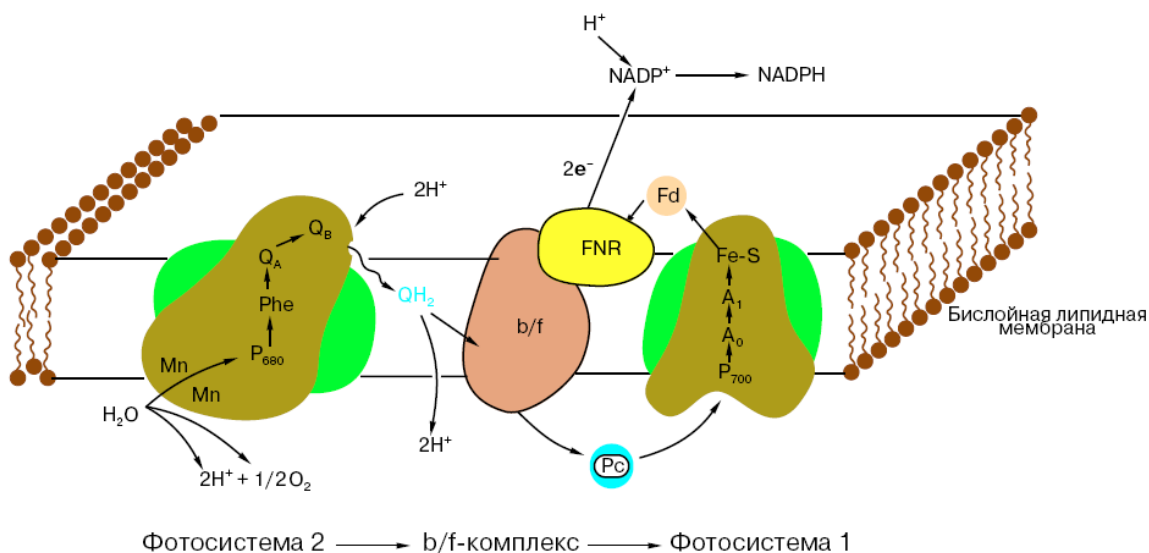


Рис. 2. Фотосинтетический аппарат растений [2].

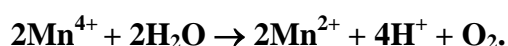
Энергия возбуждения поступает в реакционные центры из так называемых «коровых» и периферических светособирающих антенн. Коровые, или собственные антенны состоят преимущественно из молекул хлорофилла *a*. Периферические антенны, образованные светособирающим комплексом (ССК), содержат как молекулы Хл *a*, так и Хл *b* [6,7]. По этой причине изменение отношения Хл *a*/Хл *b* рассматривается как указание на изменение в стехиометрии между комплексами реакционных центров фотосистем и ССК [8].

Часть ССК, связанная с ФС1 (ССК1), находится в тилакоидах стромы, а часть,

связанная с ФС2 (ССК2), – в тилакоидах гран. Определенная часть комплексов ССК2 является лабильной [9] и способна увеличивать эффективное сечение поглощения либо ФС1, либо ФС2. Такие лабильные комплексы, способные перемещаться из гранальной области в стромальную и обратно, являются важной частью регуляторного механизма, осуществляющего распределение энергии возбуждения между ФС [10]. Этот механизм основан на обратимом фосфорилировании белка ССК и позволяет изменять соотношение между нециклическим и циклическим электронными потоками, обеспечивая требуемое соотношение между количествами НАДФН и АТФ.

Поглощая квант света, молекула хлорофилла или вспомогательного пигмента переходит в возбужденное состояние. Энергия возбуждения мигрирует по пигментной матрице и за время, не превышающее  $10^{-10} - 10^{-9}$  с [2], попадает на РЦ:  $P_{680}$  в ФС2 и  $P_{700}$  в ФС1. В реакционном центре происходит разделение заряда и перенос электрона на первичные акцепторы. Отдельная молекула хлорофилла относительно редко поглощает кванты света даже при ярком освещении, однако на один фотореакционный центр приходится 200 – 400 молекул хлорофилла, что обеспечивает достаточно частое срабатывание РЦ даже при небольшой интенсивности света. После разделения зарядов (характерное время  $\approx 10^{-12}$  с) происходит их стабилизация на время  $\geq 10^{-2}$  с, что обеспечивает эффективный перенос электронов на стадиях, ограниченных диффузией [11].

Донором электрона для окисленного РЦ ФС2 служит молекула воды, окисляемая в водорасщепляющем комплексе (ВРК). В активном центре ВРК, содержащем марганец, происходит разложение воды:



Первичный акцептор ФС1 восстанавливает конечный акцептор электронов НАДФ<sup>+</sup> через ферредоксин-НАДФ-редуктазу. Между комплексами ФС1 и ФС2 электроны переносятся по градиенту окислительно-восстановительного потенциала через цепь электронного транспорта. ЦЭТ состоит из подвижного переносчика пластохинона, цитохромного комплекса  $b_6/f$ , в состав которого входят цитохром  $f$  и два цитохрома  $b_6$ , а также медьсодержащего белка пластоцианина ( $P_c$ ), являющегося связующим звеном между  $b_6/f$ -комплексом и  $P_{700}$  (рис. 2). Описанная совокупность процессов переноса электронов называется нециклическим транспортом.

Циклический транспорт электронов, при котором работает лишь ФС1, осуществляется при замедлении или прекращении окисления НАДФН в темновой стадии фотосинтеза. Таким образом, активация циклического и нециклического транспорта электронов регулируется количеством НАДФ<sup>+</sup> в системе [12].

## 2.2. Медленная индукция флуоресценции фотосинтезирующих объектов

При освещении зеленого листа после периода темновой адаптации интенсивность флуоресценции изменяется немонотонно (эффект Каутского). Изменения O-I-D-P (рис. 3) называют первой волной, или быстрой индукцией флуоресценции (БИФ). Ее продолжительность составляет 1-3 с. Более медленные изменения P-S-M-T известны как вторая волна, или медленная индукция флуоресценции (МИФ) [13,14]. Продолжительность МИФ – от нескольких десятков секунд до нескольких минут в зависимости от объекта и условий регистрации.

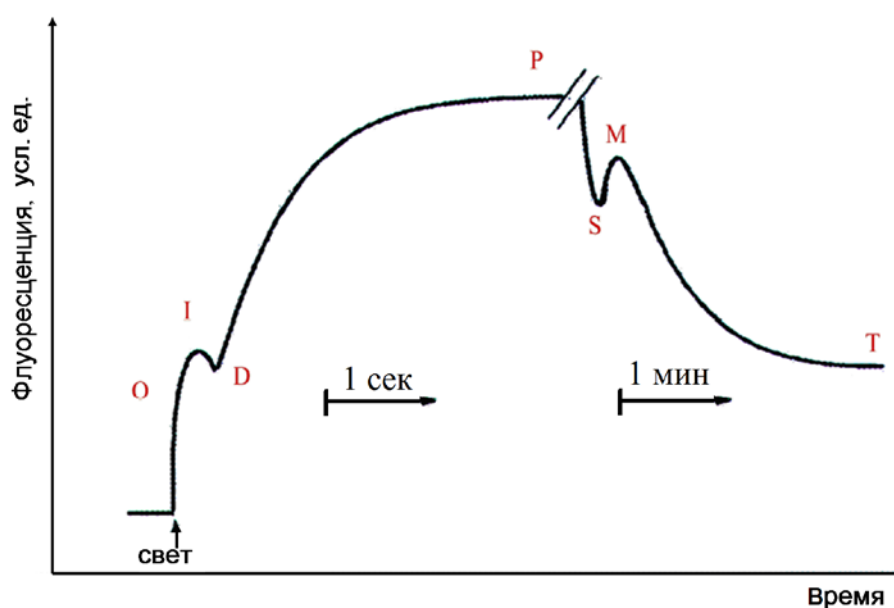


Рис. 3. Схема индукционных изменений флуоресценции фотосинтезирующих объектов [15].

Большую роль в интерпретации БИФ сыграла гипотеза Дюйзенса и Свирса (цит. по [15]), в которой флуоресценция и первичные реакции фотосинтеза рассматриваются как конкурирующие процессы. В соответствии с этой гипотезой индукционные изменения флуоресценции связаны с изменением состояния первичного акцептора электронов (Q) ФС2. В хлоропластах, адаптированных к темноте, первичный акцептор находится в окисленном состоянии и может принимать электроны от РЦ ФС2, гася тем самым флуоресценцию (уровень O на рис. 3). Интенсивность флуоресценции возрастает по мере восстановления Q и уменьшения потока электронов. Таким образом, квазистационарный уровень P отражает динамическое равновесие реакций восстановления Q через ФС2 и его окисления последующими переносчиками

электронов. Уменьшение флуоресценции на участке I-D (рис. 3) может быть объяснено тем, что акцептор Q, будучи восстановлен через ФС2, окисляется вновь последующими переносчиками в цепи электронного транспорта между фотосистемами [13].

Характерная кривая медленной индукции флуоресценции листьев растений представлена на рис. 4. В изолированных интактных хлоропластах тушение P-T, как правило, монотонное. У листьев и водорослей наблюдается переход S-M-T или более сложная кинетика флуоресценции [13,15].

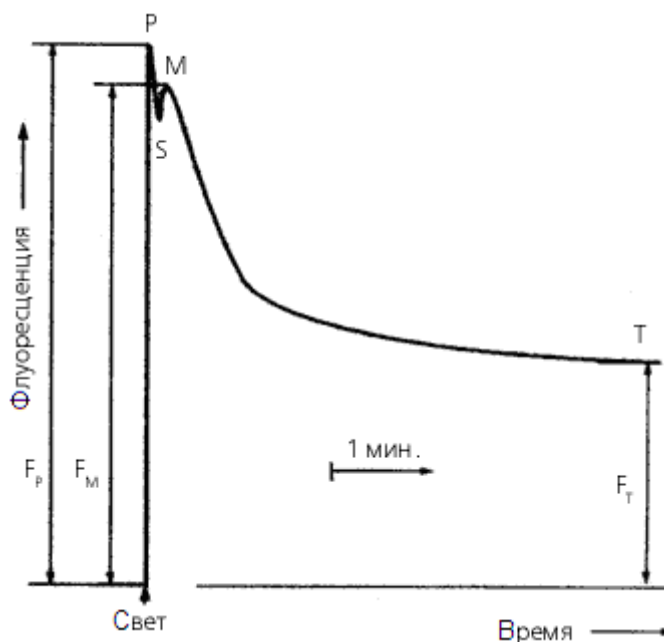


Рис.4. Характерная кривая медленной индукции флуоресценции (МИФ) листьев растений [16].

Тушение флуоресценции 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, обусловлено двумя основными факторами: (1) образованием градиента протонов  $\Delta pH$  на мембране тилакоидов и (2) перераспределением энергии возбуждения в пользу ФС1 при фосфорилировании белков светособирающего комплекса специальным ферментом протеинкиназой. Дефосфорилирование белков осуществляется ферментом фосфотазой. Активность протеинкиназы и фосфотазы зависит от окислительно-восстановительного состояния пула переносчиков электронов между ФС. Таким образом реализуется механизм, обеспечивающий согласованную работу обеих фотосистем.

В качестве параметра 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, достигаемый после нескольких минут освещения. Возможность использования этого показателя для оценки фотосинтетической активности растений была экспериментально и теоретически обоснована В.А. Караваевым [15]. Было, в частности, показано, что относительные изменения значений  $(F_M - F_T)/F_T$  при тех или иных воздействиях на растение соответствуют относительным изменениям фотосинтетической активности (скорости выделения  $O_2$  в расчете на хлорофилл) [15,17].

Несмотря на трудности в интерпретации индукционных изменений флуоресценции, этот метод широко используется для решения как фундаментальных, так и прикладных задач биофизики фотосинтеза и физиологии растений [18,19,20].

### 2.3. Спектры флуоресценции листьев растений

Спектры флуоресценции клеток, тканей и гомогенатов растений при комнатной температуре обычно имеют два широких максимума в красной области (рис. 5). Один пик флуоресценции находится в интервале длин волн 682-686 нм ( $F_{685}$ ), а другой – в интервале 730-742 нм ( $F_{740}$ ) [21,22].

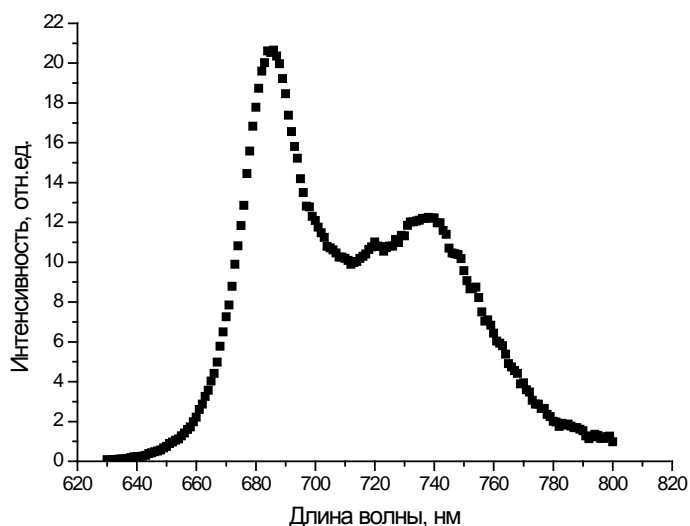


Рис. 5. Характерный спектр флуоресценции зеленого листа.

Существует несколько точек зрения на механизм возникновения люминесценции в области 680 и 730 нм. Предполагается, что флуоресценция на длине волны около 685 нм обусловлена хлорофиллом фотосистемы 2 (ФС2), а на длине волны 730 нм – ФС1 [23]. Считается также, что соотношение максимумов в спектре флуоресценции

определяется степенью агрегированности форм хлорофилла и реабсорбцией излучения [24,25]. Для количественной характеристики формы спектра был введен параметр  $\omega$ , равный отношению максимальных значений интенсивности флуоресценции в области 730-750 нм и 685 нм ( $\omega = F_{740}/F_{685}$ ). Было показано, что жизненный цикл фотосинтезирующего листа связан с возрастанием и последующим спадом длинноволновой флуоресценции. Как у молодых, так и у отмирающих тканей (независимо от причин гибели) интенсивность флуоресценции в области 730-750 нм была низкой, а значение параметра  $\omega$  – минимальным [26].

#### **2.4. Зависимость формы спектров флуоресценции от особенностей изучаемого объекта и условий регистрации**

На величину  $\omega$  влияют уровень и сбалансированность минерального питания, концентрация  $\text{CO}_2$ , освещенность и длительность светового дня, влажность почвы и воздуха. Показано, что величина  $\omega$  и относительная скорость прироста биомассы определяются одними и теми же факторами. Их изменения всегда однонаправленны, причем оптимальным условиям развития растения соответствует максимальное значение параметра  $\omega$  [26]. Зависимость параметра  $\omega$  практически от всех исследованных факторов имеет колоколообразный вид. Максимум этой зависимости наиболее резко выражен в случае, когда значения остальных параметров среды близки к оптимальным для данного растения.

Форма спектров флуоресценции хлорофилла *in vivo* во многом определяется также условиями регистрации.

В работе [26] рассмотрены биологические и инструментальные основы метода оценки физиологического состояния растений по спектрам флуоресценции хлорофилла *in vivo*. Рассмотрим основные факторы, влияющие на форму этих спектров.

- **Видоспецифичность спектров флуоресценции.** Положение длинноволнового пика флуоресценции, а также максимальное значение  $\omega_{\max}$  индивидуально для каждого конкретного вида растений, в то время как минимальные значения  $\omega_{\min}$  слабо зависят от вида и заключены в интервале 0,18–0,25.

- **Влияние гетерогенности органов и тканей.** Значения  $\omega$  могут значительно отличаться как для листьев одного и того же растения, так и для разных участков одного и того же листа.

- **Зависимость величины  $\omega$  от возраста листа и вегетационного периода** обусловлена теми же причинами, что и различия  $\omega$  для листьев, расположенных на разных ярусах растений, а именно: с возрастом могут значительно меняться содержание

хлорофилла и светорассеивающие свойства тканей листа. Зависимость  $\omega$  от времени вегетации подвержена влиянию фаз жизненного цикла (цветение, колошение).

- **Суточная динамика параметра  $\omega$ .** Один из наиболее важных факторов, который необходимо учитывать при анализе измерений *in vivo*, связан с суточными колебаниями параметра  $\omega$ . Зависимость  $\omega$  от времени суток при этом близка к классическим суточным кинетикам интенсивности фотосинтеза.

- **Влияние оптической плотности и светорассеивающих свойств образца.** Спектры флуоресценции интактного листа имеют большие значения  $F_{740}$  и  $F_{685}$  по сравнению со спектрами отдельных частиц тканей листа различных размеров, при этом отличия в дальней красной области спектра существенно больше, нежели в более коротковолновой. Это свидетельствует о значительном влиянии реабсорбции излучения в интактном листе на форму спектра флуоресценции.

Зависимость величины  $\omega$  от оптической плотности образцов имеет линейный характер и может быть записана в виде:

$$\omega = kD_{675} + \omega_{\min}, \quad (1)$$

где  $k$  – угловой коэффициент (видоспецифичен),  $\omega_{\min}$  – минимальное значение параметра  $\omega$ , соответствующее спектру, свободному от влияния реабсорбции,  $D_{675}$  – оптическая плотность на длине волны 675 нм. Согласно [26], увеличение  $D_{675}$  для интактного листа обусловлено влиянием светорассеяния, увеличивающим эффективную длину оптического пути для падающего на лист света.

- **Зависимость параметра  $\omega$  от концентрации хлорофилла.** В литературных источниках высказываются различные предположения о связи параметра  $\omega$  с концентрацией хлорофиллов  $a$  и  $b$ . Есть мнение, что спектр флуоресценции *in vivo* связан с излучением хлорофилла  $a$  [21,27]. Хлорофилл  $b$  флуоресцирует в красной области только в растворе, а в листе энергия его возбуждения полностью передается хлорофиллу  $a$ . В работе [28] было показано, что в области низких концентраций хлорофилла, как в экстрактах, так и в интактном листе, флуоресценция на длинах волн 685 и 740 нм возрастает при увеличении концентрации хлорофилла  $a$  (рис. 6А). С увеличением концентрации хлорофилла флуоресценция в длинноволновой области ( $F_{fr}$ ) меняется незначительно, в то время как коротковолновая красная флуоресценция ( $F_r$ ) существенно возрастает, а затем уменьшается из-за реабсорбции испускаемой красной флуоресценции в полосе поглощения хлорофилла.

Реоабсорбция обусловлена перекрытием коротковолновой области спектра флуоресценции хлорофилла с длинноволновой областью его спектра поглощения.

Поскольку максимум красной флуоресценции хлорофилла около 690 нм сильнее зависит от реабсорбции, чем длинноволновый максимум в области 730 - 740 нм, отношение  $F_r/F_{fr}$  (в данной статье используют параметр, обратный к  $\omega$ ) уменьшается с увеличением содержания хлорофилла. Увеличение реабсорбции с увеличением концентрации хлорофилла приводит также к смещению положения максимума красной флуоресценции  $F_{r_{max}}$  в длинноволновую область спектра (рис. 6Б).

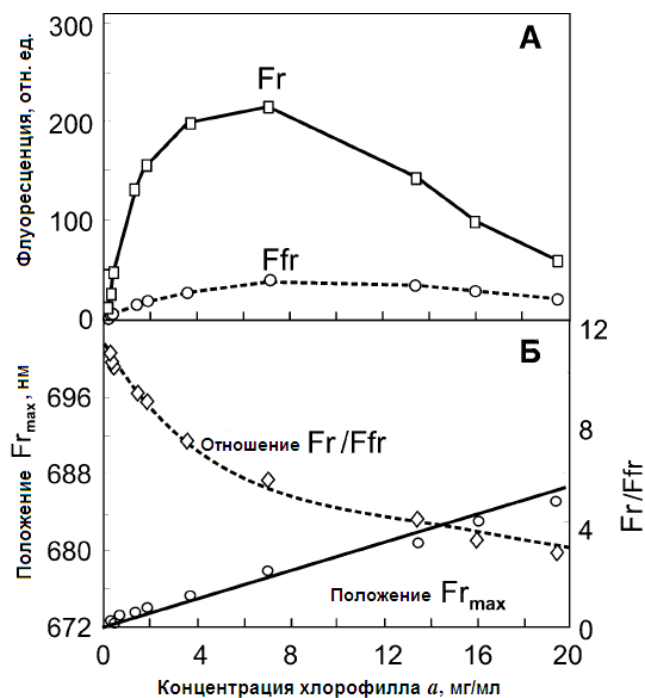


Рис. 6. (А) Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации хлорофилла  $a$  в области 685( $F_r$ ) и 740( $F_{fr}$ ) нм; (Б) Зависимость отношения  $F_r/F_{fr}$  и положения максимума красной флуоресценции  $F_{r_{max}}$  от концентрации хлорофилла [28].

По другим данным, наибольшая корреляция параметра  $\omega$  наблюдается с величиной отношения концентраций хлорофиллов  $a$  и  $b$  [29].

Различные корреляционные связи, установленные разными авторами, могут быть объяснены различиями в условиях измерения. Так, в одних случаях флуоресценция возбуждается узкополосным источником света, излучение которого способны поглощать только хлорофиллы  $a$  и  $b$ , а в других – широкополосным источником, излучение которого, кроме хлорофиллов, поглощают и другие пигменты фотосинтетической антенны. Известно также, что на интенсивность флуоресценции в дальней красной области спектра оказывает влияние мобильный светособирающий комплекс 2 (ССК2). Фосфорилирование белков этого комплекса при освещении хлоропластов вызывает усиление длинноволновой флуоресценции.

- **Зависимость величины  $\omega$  от длины волны возбуждающего света.**

Эксперименты показали [26], что величина  $\omega$  практически не зависит от длины волны возбуждения в том случае, если коэффициент пропускания листовой ткани также не зависит от  $\lambda$ . Однако для зависящего от  $\lambda$  коэффициента пропускания это не так. Чем выше коэффициент пропускания для возбуждающего света, тем значительнее поглощение в нижележащих слоях объекта и свет флуоресценции проходит больший путь в объекте. Это явление известно как эффект внутреннего фильтра [30], весьма существенный при флуоресцентных измерениях на оптически плотных объектах.

- **Зависимость величины  $\omega$  от длительности освещения листа** может быть весьма значительной. На кинетику флуоресценции  $F_{685}$  и  $F_{740}$  существенно влияет интенсивность возбуждающего света. Время установления стационарных значений флуоресценции зависит от вида растения и, возможно, его физиологического состояния. Это время составляет от 3 до 10 мин. Освещение листа приводит к увеличению вклада длинноволновой компоненты флуоресценции в регистрируемый спектр [26].

- **Влияние интенсивности возбуждающего света.** Использование для возбуждения флуоресценции света различной интенсивности (зависит от типа источника света, набора светофильтров объектива, положения апертурной диафрагмы) может дать различные значения  $\omega$  [26].

- **Влияние скорости развертки спектра.** При регистрации спектра на спектрофлуориметре измерения интенсивностей флуоресценции на длинах волн 685 нм и 740 нм происходят не одновременно, а время между регистрациями интенсивностей в соответствующих максимумах определяется скоростью развертки спектра на монохроматоре. Это может приводить к существенным искажениям величины параметра  $\omega$ . Освещение объекта, адаптированного к темноте, приводит к увеличению вклада длинноволновой компоненты флуоресценции в регистрируемый спектр. Изменение формы спектра флуоресценции листа, очевидно, наблюдается в течение времени, характерного для медленной индукции флуоресценции (см. п. 2.2) – от 3 до 10 минут. При измерениях спектров в течение времени, соответствующего наиболее сильным индукционным изменениям флуоресценции, ошибка в определении  $\omega$  может быть весьма существенной.

## **2.5. Методика коррекции спектров с учетом медленной индукции флуоресценции листьев растений**

Важным фактором, учет которого необходим при измерении флуоресценции хлорофилла *in vivo*, является изменение ее интенсивности, индуцируемое

возбуждающим излучением. Это явление, известное как «индукция флуоресценции», связано с функционированием цепи электронного транспорта фотосинтетического аппарата растений и различными механизмами тушения флуоресценции.

Классическая индукционная кривая флуоресценции включает ряд характерных подъемов и спадов (рис. 3) в секундном и минутном диапазонах времени (соответственно быстрая и медленная индукция флуоресценция, см. п. 2.2). Четкой границы между быстрой и медленной фазами нет, и продолжительность обеих сильно варьирует в зависимости от объекта и интенсивности возбуждающего излучения.

Наибольший интерес для нашего рассмотрения представляет медленная индукция флуоресценции, т. к. в данной работе использовался спектрофлуориметр, скорость регистрации спектров которого составляет около 3 нм/с. Влияние изменения интенсивности флуоресценции на форму регистрируемого спектра двояко: во-первых, это изменение не одинаково в красной и дальней красной областях спектра, и, во-вторых, продолжительность засветки до регистрации длинноволнового максимума оказывается больше.

Среди целого ряда светоиндуцированных механизмов тушения флуоресценции *in vivo* наиболее важными в смысле искажения формы спектров являются: (1) тушение, связанное с образованием градиента протонов на мембране тилакоидов и (2) АТФ-зависимое тушение. Последнее связано с фосфорилированием светособирающих хлорофилл-белковых комплексов, что ведет к перераспределению энергии возбуждения между фотосистемами 2 и 1 [31,32] (так называемый переход «состояние 1» – «состояние 2»). Рассмотрим метод, позволяющий учесть любые изменения флуоресценции и исключить их влияние уже на стадии регистрации спектра [21].

Предварительно регистрируют спектр флуоресценции листа при минимальной интенсивности возбуждения, по которому определяют точное положение максимумов на шкале длин волн и, соответственно, временной интервал между их регистрациями ( $t_1$ ) по известной скорости развертки спектра (рис. 7А). Затем регистрируют кинетики флуоресценции для обоих максимумов при тех же условиях, при которых будут производиться измерения. Полученные кинетики нормируют на начальную интенсивность, которая принимается за 100% (рис. 7Б). Затем находят участок, для которого расстояние по оси абсцисс между кинетическими кривыми для двух длин волн в принятом масштабе соответствует  $t_1$  (рис. 7Б). Измерив расстояние по оси абсцисс от нуля до начала этого участка, получают время  $t_2$ , которое должно пройти от начала засветки до момента регистрации первого максимума, чтобы соотношение обоих максимумов соответствовало начальному.

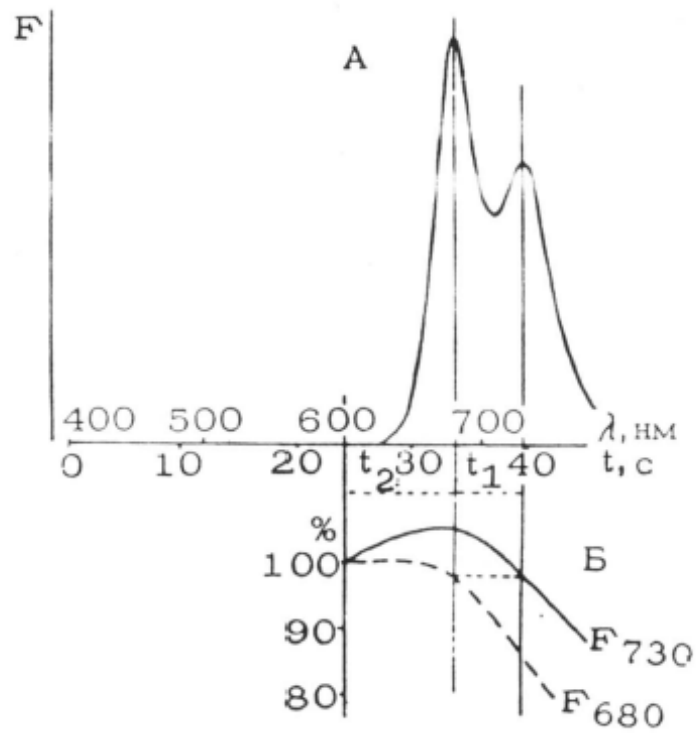


Рис. 7. Методика коррекции спектров флуоресценции с учетом медленной индукции флуоресценции листьев растений. А – спектр флуоресценции интактного листа; Б – индукционные изменения флуоресценции листа. Возбуждение 405-436 нм [26].

### 3. Объекты и методика экспериментов

#### 3.1. Объекты исследования

В данной работе изучены спектры флуоресценции листьев бобов (*Vicia faba* L., сорт “Русские черные”), а также кинетики показателя  $\omega = F_{740}/F_{685}$  при включении освещения. В основной части экспериментов использовали листья второго яруса растений, выращенных в лабораторных условиях, в пакетах с землей объемом около 0,5 л при естественном освещении до стадии 3-х ярусов листьев. Семена предварительно замачивали в теплой воде в течение 3 часов.

Для опытов с различными режимами освещения образцы на восьмой день после посадки разделяли на 5 или 6 групп и выращивали далее при разной освещенности. Например, в одном из экспериментов первая группа растений была размещена вблизи окна в условиях прямого попадания солнечных лучей, вторая – также вблизи окна, но производилась дополнительная подсветка люминесцентной лампой (8 часов в день), третья группа располагалась на расстоянии 3 метров от окна, чтобы исключить воздействие прямых солнечных лучей, четвертая – на расстоянии 4,5 метра от окна, где наблюдался недостаток естественного освещения. Последняя часть посадки находилась в 5 метрах от окна в условиях сильного затенения. Измерения проводили на восьмой день после деления (сформировано три яруса листьев).

#### 3.2. Методика обработки образцов

Обработку листьев и проростков бобов физиологическими активными веществами проводили тремя основными способами:

1. Растворы исследуемых веществ (диурон, ТМПД, фторид натрия) вводили в лист через жилку с помощью медицинского шприца.

2. Проростки бобов выращивали на растворах хлорида кадмия в условиях гидропоники. Измерения проводили спустя 2 недели после пересадки бобов на растворы  $\text{CdCl}_2$ , когда на стебле было 3 яруса листьев.

3. Проростки бобов опрыскивали соответствующими препаратами (эпин-экстра, феровит, силиплант, чистолан) из пульверизатора.

При обработке растений использовали следующие препараты:

- **Диурон ( $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{C}_{12}\text{N}_2\text{O}$ )**, структурная формула приведена на рис. 8. Это гербицид, который применяют для уничтожения однодольных и двудольных сорняков. Препарат блокирует цепь электронного транспорта после первичного акцептора фотосистемы 2, и первичные процессы фотосинтеза нарушаются.



Известное из литературы (см. [15]) ингибирующее действие диурана на фотосинтетическую активность было подтверждено в специально проведенных экспериментах. В этих опытах растворы диурана (в концентрации  $10^{-6} \div 10^{-3}$  М) вводили в лист через жилку, а затем измеряли медленную индукцию флуоресценции листа на автоматизированной установке согласно методике, описанной в [8]. Степень ингибирования ЦЭТ оценивали по уменьшению показателя  $F_M/F_T$ , где  $F_M$  – максимальное, а  $F_T$  – стационарные значения интенсивности флуоресценции. При этом были получены результаты, аналогичные содержащимся в [33]. Для последующих измерений была выбрана концентрация  $10^{-4}$  М, при которой тушение флуоресценции при регистрации МИФ практически полностью отсутствовало (полное ингибирование фотосинтеза).

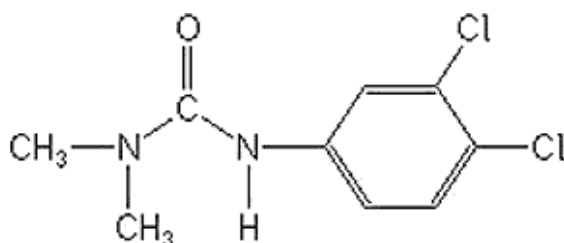


Рис. 8. Структурная формула диурана.

В первой серии опытов раствор диурана вводили в срезанный лист через центральную жилку с помощью шприца, а регистрацию спектров производили непосредственно после этого. В контроле в лист вводили дистиллированную воду.

Во второй серии опытов обработку диураном проводили за сутки или за один час до измерений, не отрывая лист от стебля. Затем лист выдерживали на свету, после чего его срывали и регистрировали спектры. В специальных экспериментах в обработанный таким образом лист непосредственно перед измерением спектров вводили раствор ТМПД (см. ниже).

- **Фторид натрия (NaF).** Фторид натрия блокирует фермент фосфатазу, препятствуя дефосфорилированию белков светособирающих комплексов ССК2. Для эксперимента использовали раствор концентрации  $10^{-2}$  М [34]. Вещество вводили в срезанный лист через центральную жилку непосредственно перед измерениями.

- **$N,N,N',N'$ -тетраметил-*p*-фенилендиаминдигидрохлорид (ТМПД,  $C_{10}H_{18}N_2Cl_2$ ).** Это вещество (см. рис. 9) является донором электронов для фотосистемы 2, а также эффективно действует как акцептор электронов в фотосистеме 1, то есть способствует устойчивому переносу зарядов между фотосистемами, минуя цитохром  $b_6/f$ .

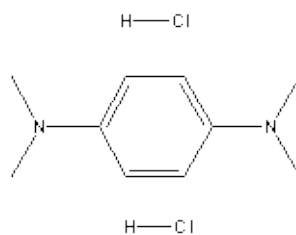


Рис. 9. Структурная формула ТМПД.

В эксперименте была использована концентрация рабочего вещества  $1,4 \cdot 10^{-4}$  М. ТМПД вводили в жилку листа, а затем сразу производили регстрацию спектров. Выбранные для измерений листья были разделены на 4 варианта: в первом варианте за сутки до эксперимента в центральную жилку листа, не отрывая от стебля, вводили дистиллированную воду, во втором – диурон (концентрация  $10^{-4}$  М), в третьем диурон вводили за час до эксперимента, а в четвертом листья не подвергали никакому дополнительному воздействию.

- **Хлорид кадмия ( $\text{CdCl}_2$ ).** Хлорид кадмия относится к солям тяжелых металлов. Известным свойством этих солей является их ингибирующее действие на первичные процессы фотосинтеза [35]. Избыток тяжелых металлов отрицательно влияет на растение, нарушается нормальный процесс дыхания и фотосинтеза. Внешними признаками могут быть бледные, пережженные или коричневые листья.

В этих опытах семена бобов высаживали в пакеты с грунтом, а через неделю укоренившиеся проростки пересаживали в стаканы с растворами  $\text{CdCl}_2$  концентраций  $10^{-4}$  М и  $10^{-6}$  М и выращивали далее в условиях гидропоники. В контроле использовали водопроводную воду. Измерения проводили спустя 2 недели, когда на стебле было 3 яруса листьев.

- **Регулятор роста эпин-экстра.** Препарат "Эпин-экстра" – это спиртовой раствор эпибрасинолида концентрации 0,025 г/л. Эпибрасинолид (рис. 10) относится к группе брасинолидов - фитогормонов, поддерживающих в норме иммунную систему растений в стрессовых ситуациях. Физиологическая роль этих веществ на данный момент еще не вполне изучена. В настоящее время фитогормоны рассматриваются как возможные участники трансдукции светового сигнала. Препарат используется для восполнения недостатка естественных брасинолидов и нормального развития растения в течение всей вегетации.

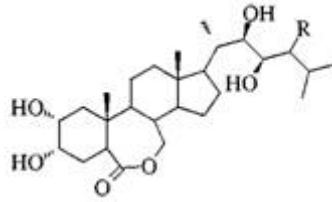


Рис.10. Структурная формула эпибрасинолида.

В соответствии с инструкцией готовили водный раствор препарата 0,4 мл/л. Проростки бобов опрыскивали дважды: первый раз – на стадии распустившихся листьев третьего яруса, второй раз – через 2 дня. Измерения производили на следующий день после второй обработки.

- **Препарат силиплант.** Это микроудобрение с высоким содержанием кремния и микроэлементов в хелатной форме. Увеличение количества кремния в тканях растений повышает их устойчивость к различным стрессам. Наличие кремнезема в клеточных стенках растений повышает их прочность, устойчивость зерновых культур к полеганию. Кремний повышает морозоустойчивость и засухоустойчивость, активность фотосинтеза, способствует активному росту корневой системы и листового аппарата. Он принимает активное участие в нуклеиновом, белковом углеводном обмене, стимулирует фосфолирование и другие процессы обмена, а также транспорт протеинов и углеводов. Повышает активность ферментов, участвующих в окислительно-восстановительных процессах.

Препарат разводили в воде в рекомендуемой дозе 5 мл/л. Опрыскивания и измерения производили аналогично опытам с эпином-экстра.

- **Гербицид чистолан.** Это гербицид на основе малолетучих эфиров 2,4-Д и дикамбы (относятся к гормональным гербицидам системного действия). Отрицательно влияет на обмен нуклеиновых кислот, синтез белков и других процессах. Препарат проникает в растение в основном через листья и передвигается по всему растению, накапливаясь в молодых тканях листьев, стеблей и корней.

Согласно инструкции препарат разводили в воде в концентрации 2 мл/л. Обработку и регистрацию спектров проводили аналогично опытам с эпином-экстра.

- **Активатор фотосинтеза феровит.** Препарат является раствором хелатного железа не менее 75 г/л и азота – 40 г/л в виде мочевины. Железо является важным катализатором образования хлорофилла, участвующего в процессах фотосинтеза и дыхания. Применение препарата восполняет недостаток освещенности, активизируя синтез хлорофилла, способствует восстановлению, поврежденного вредными

организмами белково-пигментного комплекса хлоропластов.

Для обработки готовили водный раствор препарата в рекомендуемой инструкцией дозе 1,5 мл/л. Опрыскивания и измерения производили аналогично опытам с эпином-экстра.

Препарат ТМПД был любезно предоставлен проф. А.Н. Тихоновым, гербицид чистолан – проф. Л.Э. Гунар, препарат эпин-экстра, силиплант и феровит – проф. Л.А. Дорожкиной.

### 3.3. Регистрация спектров флуоресценции

Лист помещали в держатель спектрофлуориметра Solar CM2203 (рис. 11), предварительно 70 секунд освещали светом с длиной волны 450 нм и снимали исходный спектр, затем выдерживали в темноте в течение 5 минут, а затем с интервалом в минуту снимали 10 спектров флуоресценции при освещении светом той же длины волны.

Спектры флуоресценции листьев растений одного и того же яруса несколько отличались по интенсивности. Из соображений унификации и стандартизации эксперимента рассматривали относительные характеристики (показатель  $\omega = F_{740}/F_{685}$ ) и усредненные значения интенсивностей флуоресценции. Усреднение производили по трем спектрам флуоресценции, полученным на разных листьях.

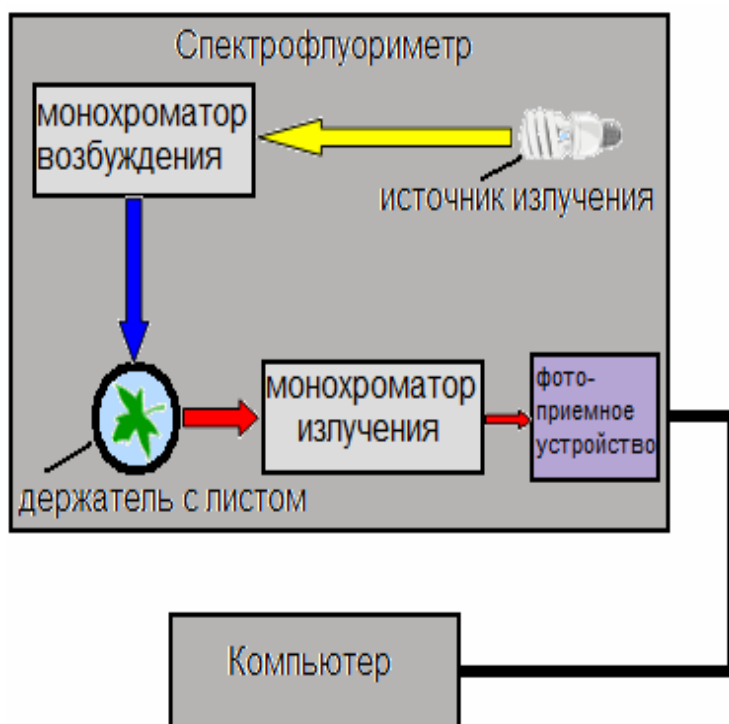


Рис. 11.Схема установки для измерения спектров флуоресценции.

В качестве основной измеряемой характеристики было выбрано отношение

интенсивностей флуоресценции на длинах волн 740 нм и 685 нм.

### 3.4. Регистрация медленной индукции флуоресценции на длинах волн 685 и 740 нм

Определение величины параметра  $\omega$ , который является интегральным показателем физиологического состояния и фотосинтетической активности растения, возможно не только путем регистрации спектров флуоресценции. Спектрофлуориметр Solar CM2203 имеет функцию измерения временных зависимостей флуоресценции одновременно на двух длинах волн, что было использовано в наших исследованиях. Медленная индукция флуоресценции регистрировалась в течение 20 минут на длинах волн 685 и 740 нм (рис. 12). Такая методика позволяет исключить влияние индукционных процессов на величину измеряемого отношения  $F_{740}/F_{685}$ , т. к. интенсивности измеряются одновременно, в отличие от спектров, где длинноволновый пик регистрируется позже коротковолнового.

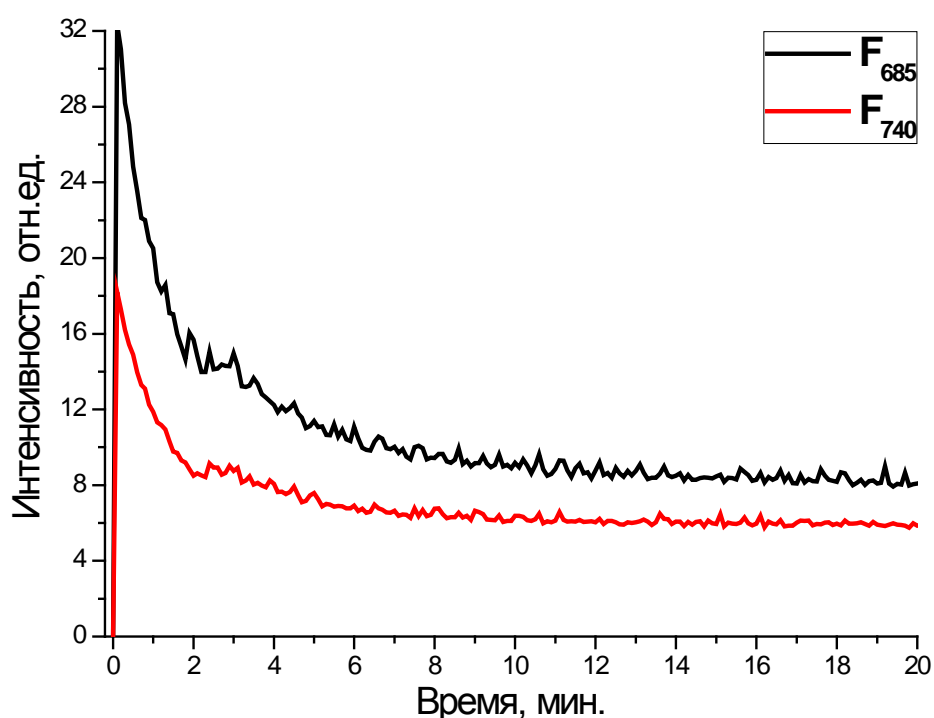


Рис. 12. Медленная индукция флуоресценции на длинах волн 685 и 740 нм.

### 3.5. Измерение содержания хлорофилла в листьях

Содержание хлорофиллов *a* и *b* в листьях растений определяли по методу, описанному в [36]. Навеску листьев массой 120 мг растирали в фарфоровой ступке, добавляя 80%-ный ацетон. Полученную вытяжку фильтровали через стеклянный фильтр №2 с помощью водоструйного насоса и доводили её объём до 25 мл. Спектры

поглощения полученного раствора измеряли на двухлучевом спектрофотометре АЕ-UV1602 и находили значение оптической плотности на длинах волн 649 нм и 665 нм, соответствующих максимумам поглощения хлорофиллов *a* и *b* в 80%-ном ацетоне.

Концентрацию хлорофилла определяли по формулам Вернона [36]:

$$C_a \text{ (мг/л)} = 11,63 \cdot D_{665} - 2,39 \cdot D_{649},$$

$$C_b \text{ (мг/л)} = 20,11 \cdot D_{649} - 5,18 \cdot D_{665},$$

где *C* – концентрация хлорофилла в растворе, *D* – соответствующая оптическая плотность.

### **3.6. Измерение интенсивности освещения**

Измерения проводили при помощи портативного цифрового люксметра Mastech MS6610. Прибор имеет три диапазона измерений: 0-2000 лк; 2000-19900 лк; 20000-50000 лк. Ошибка измерения при работе в любом диапазоне не превышает 5%. Прибор был любезно предоставлен В.В. Птушенко.

### **3.7. Корректировка интенсивностей пиков спектров флуоресценции**

Для получения наиболее полной информации о воздействии физиологически активных веществ на фотосинтетический аппарат растений представляется важным определять соотношение максимумов в спектре флуоресценции листа сразу после темновой адаптации. Для исключения индукционных эффектов мы использовали метод, аналогичный описанному в п.2.5. Для каждого образца, помимо серии спектров, регистрировали также индукционные кривые флуоресценции на длинах волн 685 и 740 нм. По известной скорости развертки спектра определяли интервал времени, которое проходит от начала засветки до момента регистрации первого ( $t_1 = 20,1$  с) и второго ( $t_2 = 40,2$  с) максимумов. Используя кривые индукции флуоресценции, находили отношение начальной интенсивности к интенсивностям в интересующие нас моменты времени (20,1 с для первого пика и 40,2 с – для второго), после чего умножали интенсивность каждого пика спектра, снятого после темновой адаптации, на соответствующее найденное отношение. Полученные значения интенсивности соответствуют реальным максимальным значениям в момент времени сразу после включения возбуждающего света.

## 4. Результаты и обсуждение

### 4.1. Опыты с физиологически активными веществами с известным избирательным действием на фотосинтетический аппарат

#### 4.1.1. Диурон и фторид натрия

Регистрацию спектров флуоресценции проводили по схеме, описанной в п.3.3. Как показали опыты, после 3÷10 минут освещения листа спектры флуоресценции практически не меняются (рис. 13). Это объясняется установлением стационарного уровня интенсивности флуоресценции. Поэтому представляется более удобным рассматривать два спектра: спектр, регистрируемый после пяти минут темновой адаптации, и спектр после десяти минут освещения возбуждающим светом.

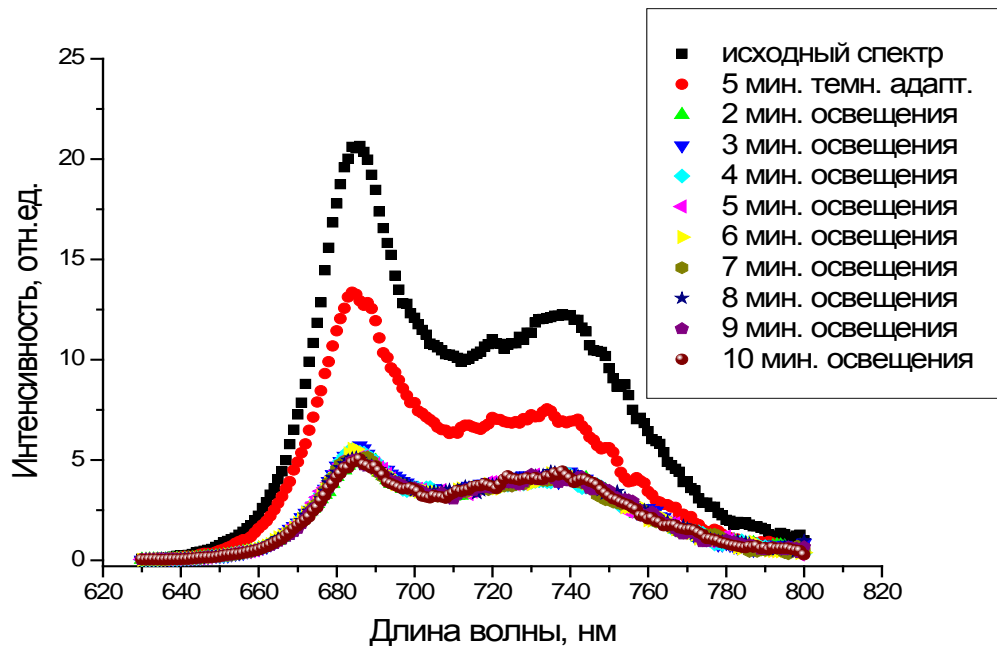


Рис. 13. Пример серии спектров флуоресценции зеленого листа.

На рис. 14 приведены спектры флуоресценции листьев бобов, в жилку которых была введена дистиллированная вода (контроль), раствор фторида натрия концентрации  $10^{-2}$  М и раствор диурона концентрации  $10^{-4}$  М. Черным цветом обозначен спектр, полученный после пяти минут темновой адаптации листа, красным – после 10 минут освещения, столбиками на графиках обозначены значения интенсивностей пиков в момент включения возбуждающего света (см. п. 3.7). Индукционные изменения флуоресценции листа, обработанного диуроном, практически отсутствуют, поэтому

начальные интенсивности не обозначены.

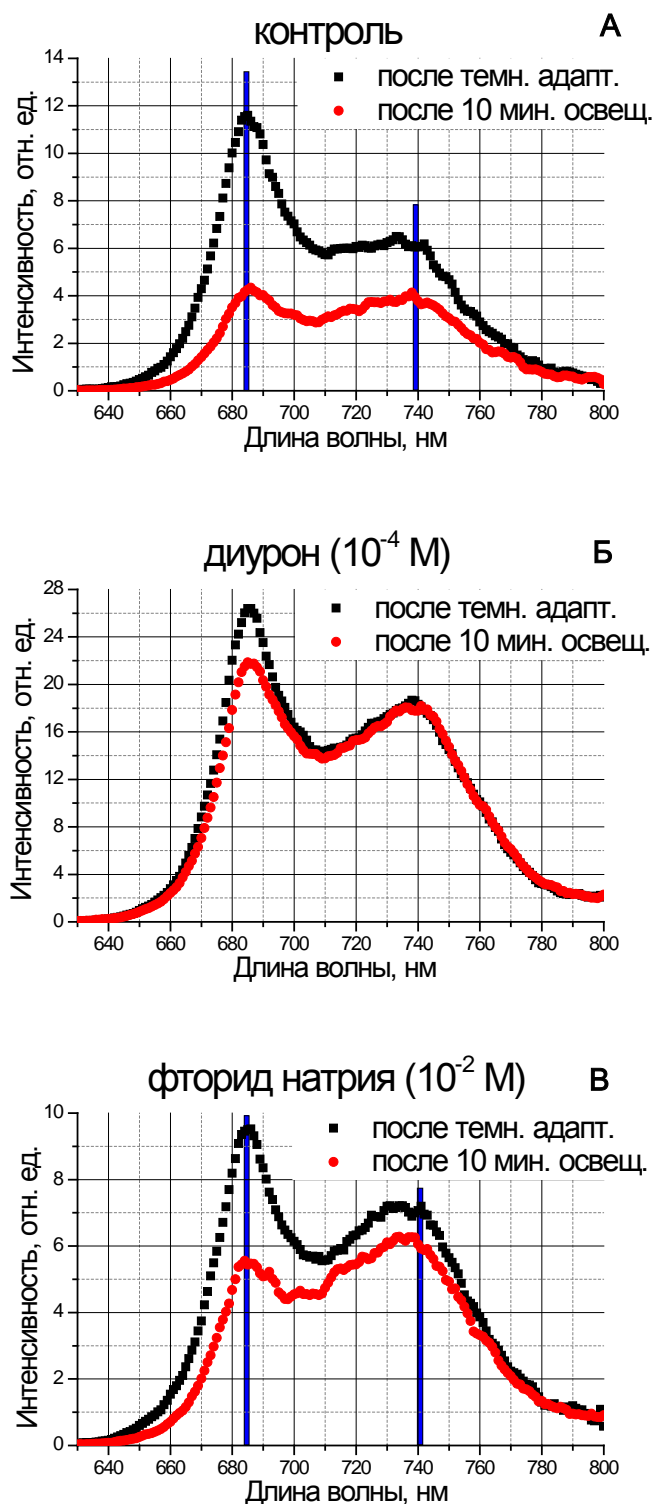


Рис. 14. Спектры флуоресценции листьев бобов: (А) контроль; (Б) диурон; (В) фторид натрия.

В контроле (рис. 14А) интенсивность обеих полос флуоресценции постепенно уменьшается по мере освещения листа. Этот эффект обусловлен хорошо известным явлением медленной индукции флуоресценции, описанном в обзоре литературы.



Тушение флуоресценции при освещении адаптированного к темноте листа связано главным образом с образованием градиента протонов на мембране тилакоидов, а также с перераспределением энергии возбуждения между фотосистемами в пользу ФС1. Последнее обстоятельство приводит к тому, что по мере освещения листа значение  $\omega = F_{740}/F_{685}$  постепенно увеличивается: от  $\omega \approx 0,6$  для спектра, полученного после темновой адаптации, до  $\omega \approx 1,0$  для спектра после 10 минут освещения. Диурон блокирует цепь электронного транспорта после первичного акцептора фотосистемы 2. В результате интенсивность флуоресценции значительно возрастает, и тушения флуоресценции при освещении листа практически не происходит (рис. 14Б). Незначительное тушение на длине волны 685 нм (см. также рис. 15Б) описано в литературе [15]. Оно может быть связано либо с неабсолютным характером ингибирования ЦЭТ диуроном, либо с механизмами тушения флуоресценции в светособирающей антенне.

Фторид натрия блокирует фермент фосфатазу, препятствуя дефосфорилированию светособирающих комплексов ССК2. Таким образом, количество энергии, поступающей в фотосистему 1, оказывается больше поступающей в фотосистему 2, и относительный вклад длинноволновой флуоресценции оказывается больше (рис. 14, А и В). Тушение флуоресценции оказывается при этом меньше, чем в контроле, возможно, вследствие меньших достигаемых значений  $\Delta pH$  на мембране тилакоидов.

#### 4.1.2. Диурон и ТМПД

Спектры флуоресценции листьев бобов, обработанных ТМПД и диуроном, приведены на рис. 15. У листьев, обработанных ТМПД (рис. 15Г), тушение флуоресценции, наблюдаемое после 10 минут освещения, заметно больше, чем в контроле. ТМПД оказывает влияние на нециклический транспорт электронов. Являясь донором электронов для фотосистемы 1 и акцептором для фотосистемы 2, это вещество создает альтернативный путь передачи зарядов между фотосистемами. Диурон же ингибирует транспорт электронов по ЦЭТ (рис. 15Б). Представлялось интересным выяснить, какое действие на спектры флуоресценции и фотосинтетический аппарат окажет совместное применение этих веществ. При совместной обработке этими веществами ингибирующий эффект диурона сохранялся (рис. 15, Д и Е), однако интенсивности пиков флуоресценции заметно падали по сравнению с листом, обработанным только диуроном (рис. 15Б).

Можно предположить, что отмеченные выше изменения спектров флуоресценции в присутствии ТМПД связаны с его влиянием на окислительно-восстановительное

состояние первичных акцепторов электронов ФС2.

Также в этом эксперименте были измерены спектры флуоресценции листьев, в которые за сутки до измерения в жилку была введена дистиллированная вода. При сравнении с контролем выяснилось, что никакого существенного влияния на спектры и фотосинтетическую активность такое воздействие не оказывает.

#### **4.2. Опыты с хлоридом кадмия**

В этих опытах растения выращивали на водных растворах  $\text{CdCl}_2$  в условиях гидропоники. Методика проведения этих экспериментов описана в разделе 3.

Отличительная особенность спектров флуоресценции листьев бобов, обработанных  $\text{CdCl}_2$  – уменьшение тушения флуоресценции на длинах волн 685 и 740 нм (рис. 16). С увеличением концентрации  $\text{CdCl}_2$  степень тушения флуоресценции уменьшается (рис. 16, Б и В). Эти изменения спектров соответствуют известному из литературы ингибирующему действию солей тяжелых металлов на фотосинтетический аппарат растений.

Параметр  $\omega$  для листьев растений, выращенных на растворах хлорида кадмия, оказывается ниже, чем в контроле, и с увеличением концентрации  $\text{CdCl}_2$  значения  $\omega$  уменьшаются. Это свидетельствует об ухудшении общего физиологического состояния растения [26] и снижении содержания хлорофилла в листьях (см. раздел 4.4).

#### **4.3. Опыты с гербицидами и стимуляторами роста**

Данные эксперименты проводились с целью выяснения влияния некоторых препаратов, предназначенных для использования в сельскохозяйственной практике, на фотосинтетический аппарат растений. В этих опытах использовали следующие препараты: гербицид чистолан, регулятор роста эпин-экстра, активатор фотосинтеза феровит и кремний-содержащий препарат силиплант. Методика обработки проростков бобов этими препаратами описана в п. 3.2. Наибольшее стимулирующее действие оказал препарат феровит (рис. 1715Б). Тушение флуоресценции при его применении оказалось существенно больше, чем в контроле.

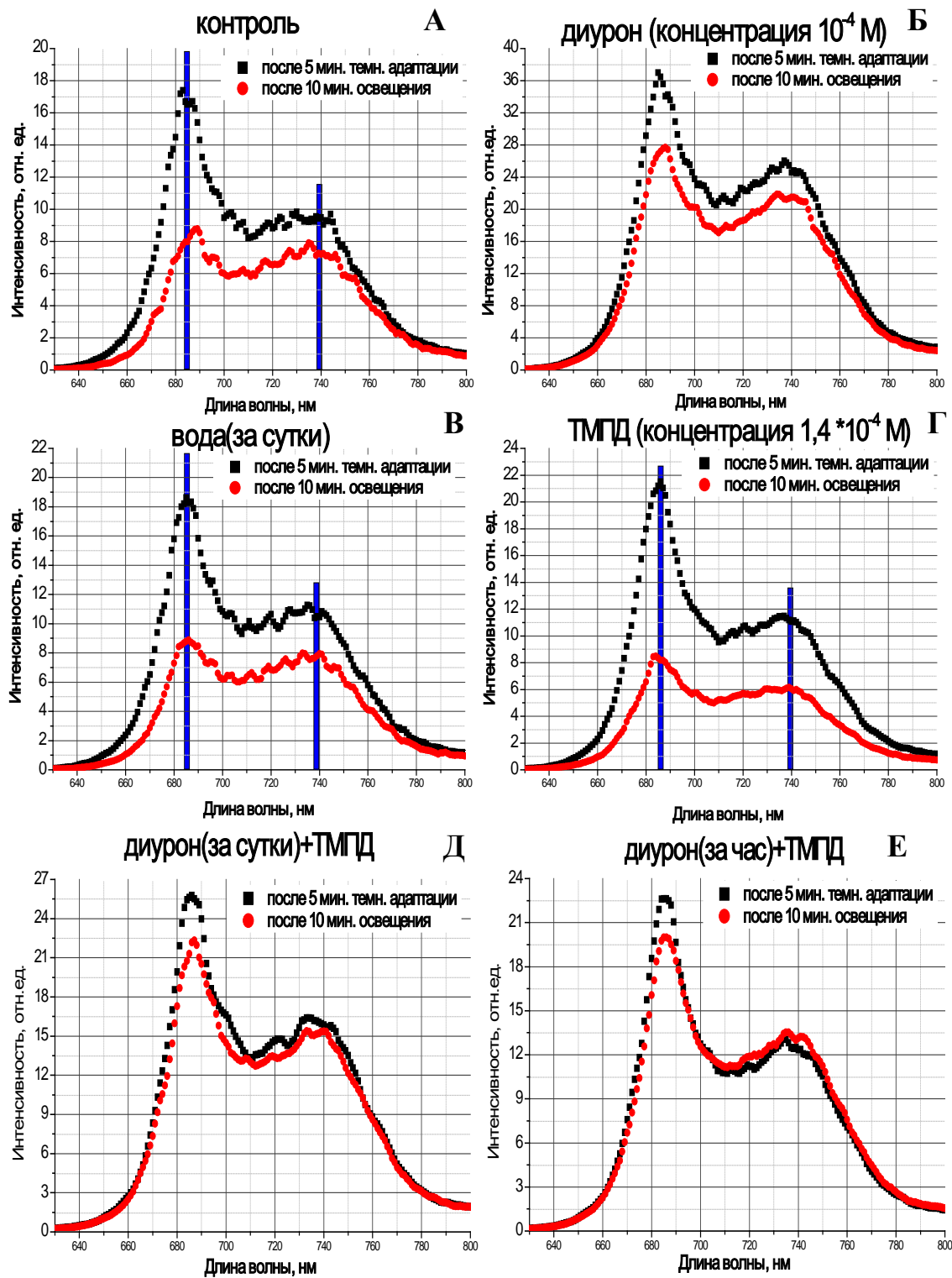


Рис. 16. Спектры флуоресценции листьев бобов: (А) контроль; (Б) диурон; (В) вода; (Г) ТМФД; (Д) диурон (обработка за сутки до измерения) совместно с ТМФД; (Е) диурон (обработка за час до измерения) совместно с ТМФД.

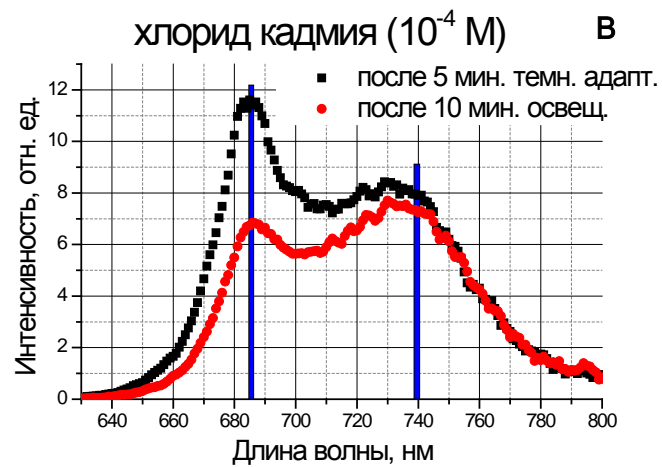
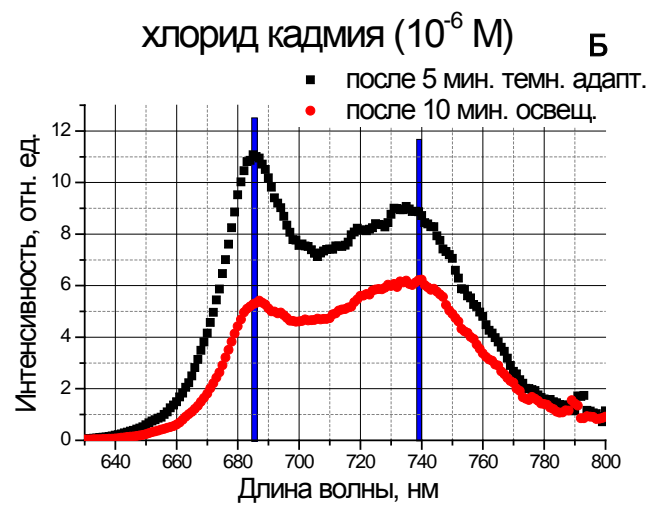
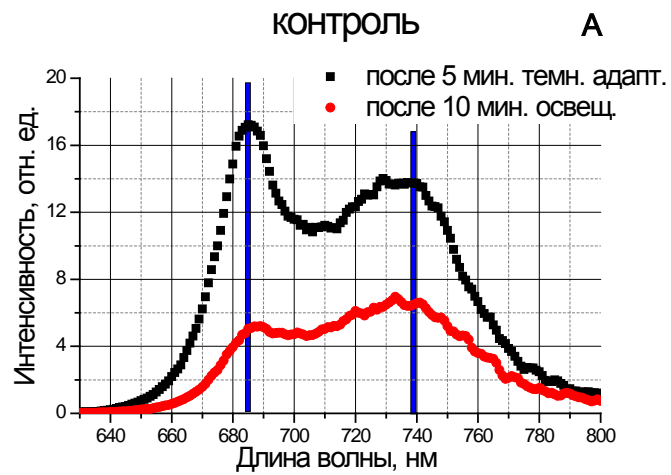


Рис. 17. Спектры флуоресценции листьев бобов: (А) контроль; (Б) хлорид кадмия, концентрация  $10^{-6}$  М; (В) хлорид кадмия, концентрация  $10^{-4}$  М.

У растений, обработанных гербицидом чистолан, напротив, наблюдалось заметно меньшее тушение флуоресценции по сравнению с контролем и другими препаратами. Относительные вклады длинноволновой и коротковолновой полос флуоресценции в спектр по мере освещения практически не менялись (рис. 17Г). Спектры схожи с аналогичными для диурона. Это свидетельствует об угнетающем действии чистолана на растения, которое отразилось не только на спектрах, но и на внешнем виде образцов: на пятый день после первого опрыскивания проростки бобов, обработанные данным препаратом, практически полностью увяли.

Спектры флуоресценции листьев растений, обработанных препаратами силиплант и эпин-экстра, существенных различий с контрольными не имели.

#### **4.4. Эксперименты по выращиванию растений в различных условиях освещенности**

Использование различных световых режимов при выращивании оказывает воздействие на внешний вид проростков. Для растений, выращенных при низких интенсивностях света, были характерны длинные стебли, тонкие вытянутые листья с бледно-зеленой окраской. При относительно высоких интенсивностях света (200 лк и более) растения имели хорошо развитые листья, сбалансированный рост, насыщенную зеленую окраску.

Было проведено две серии экспериментов по выращиванию проростков бобов в различных условиях освещения. Результаты 1-й серии (5 вариантов по освещенности) представлены на рис. 19-21 и в табл. 1, результаты 2-й серии – на рис 22 и в табл. 2.

В спектрах, изображенных на рис. 19, наблюдается ярко выраженная тенденция уменьшения тушения флуоресценции, а также вклада длинноволновой полосы флуоресценции при снижении интенсивности освещения. В спектрах флуоресценции растений, выращенных при слабом и сильном затенении (рис 19, Г и Д) тушение полностью отсутствует (эффект схож с ингибированием электронного транспорта диуроном), а пик в дальней красной области превращается в плато. Кроме того, по мере уменьшения освещенности наблюдалось снижение интенсивности обоих пиков флуоресценции, что свидетельствует об уменьшении содержания в листьях хлорофилла.

В этой серии экспериментов листья бобов, выращенных при минимальной освещенности, в жилку вводили диурон. Результатом такого воздействия явилось резкое увеличение интенсивности флуоресценции в 2,5 раза (рис. 19Е).

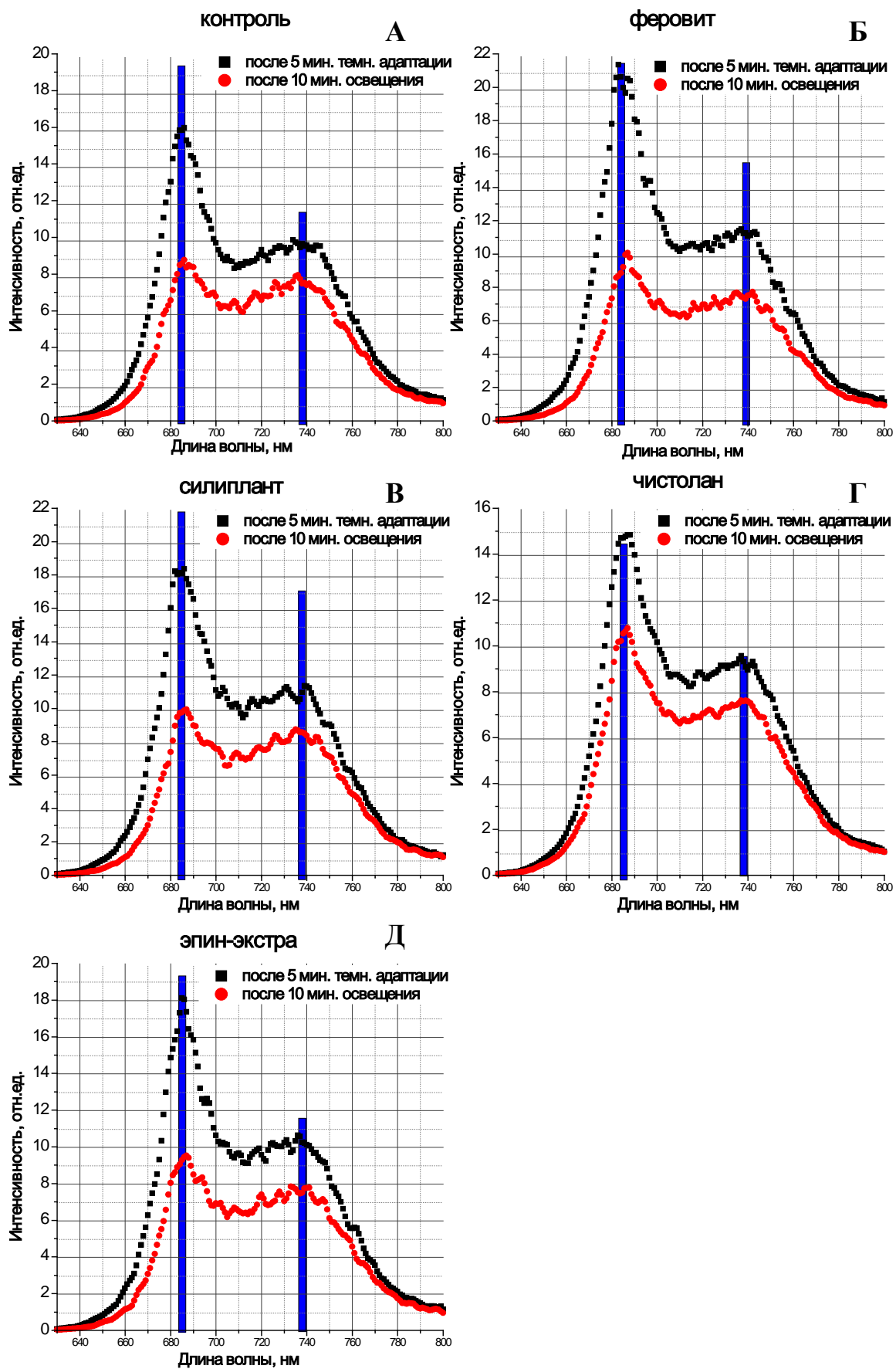


Рис. 18. Спектры флуоресценции листьев бобов: (А) контроль; (Б) феровит; (В) силиплант; (Г) чистолан; (Д) эпин-экстра.

Отмеченные выше закономерности в изменении спектров флуоресценции отражаются в кинетических изменениях показателя  $\omega = F_{740}/F_{685}$  (рис. 20). Из этих зависимостей видно, что  $\omega$  уменьшается по мере затенения растений. У проростков, выращенных на относительно сильном свете (дополнительное освещение лампой, естественный свет) наблюдается изменение формы спектра при освещении образца в камере спектрофлуориметра – вклад длинноволновой полосы флуоресценции возрастает, и  $\omega$  увеличивается. У растений, выращенных на относительно слабом свете, изменений  $\omega$  при освещении в камере спектрофлуориметра не наблюдается. Очевидно, это связано с тем, что у растений этих вариантов фотосинтетический аппарат в полной мере не сформирован. Это приводит к тому, что степень восстановленности акцепторов ФС2 оказывается недостаточно высокой для активации фермента протеинкиназы и перераспределения энергии возбуждения в пользу ФС1 не происходит (индукция флуоресценции отсутствует). В пользу низкой восстановленности акцепторов ФС2 свидетельствует резкое возрастание интенсивности флуоресценции при обработке листьев этих растений диуроном (рис. 19Е).

Растения, выращенные при разной освещенности, существенно отличались по содержанию хлорофилла (табл. 1, 2).

Была построена зависимость параметра  $\omega$  от суммарного содержания хлорофилла ( $Xл a + Xл b$ ) (рис. 21, 22). Выявлена высокая корреляция между параметром  $\omega$  спектра флуоресценции и содержанием хлорофилла в листе. Коэффициенты корреляции составляли 0,997 для 1-й серии экспериментов (рис. 21) и 0,991 для 2-й серии экспериментов (рис. 22). Эти результаты подтверждают данные о высокой корреляции между значением  $\omega$ , с одной стороны, и содержанием хлорофилла в листе – с другой, полученные рядом авторов [21,27,28].

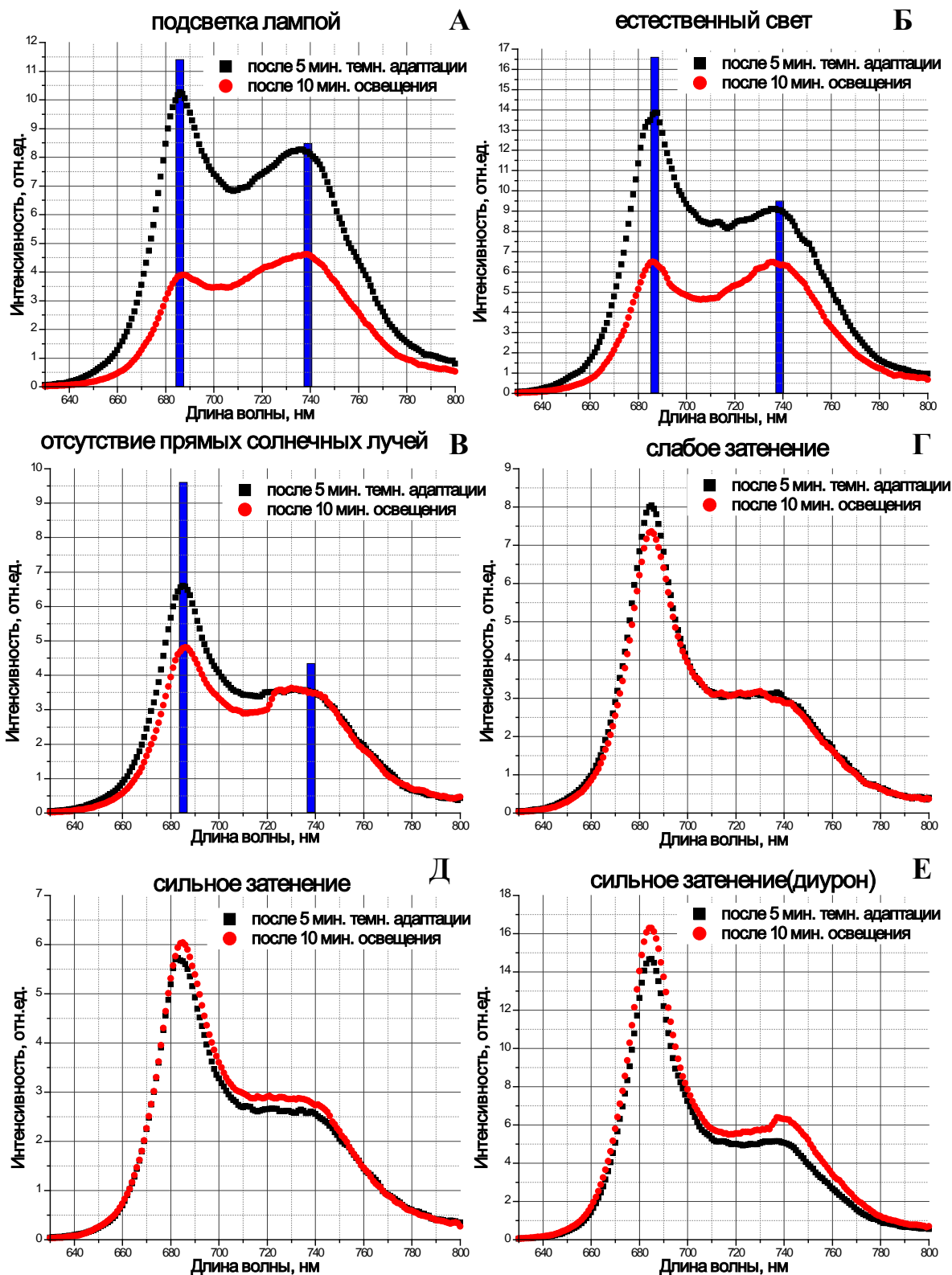


Рис.19. Спектры флуоресценции листьев бобов, выращенных в разных световых режимах: (А) естественный свет; (Б) дополнительное освещение лампой; (В) отсутствие прямых солнечных лучей; (Г) слабое затенение; (Д) сильное затенение; (Е) обработка диуроном растений, выращенных в условиях сильного затенения.



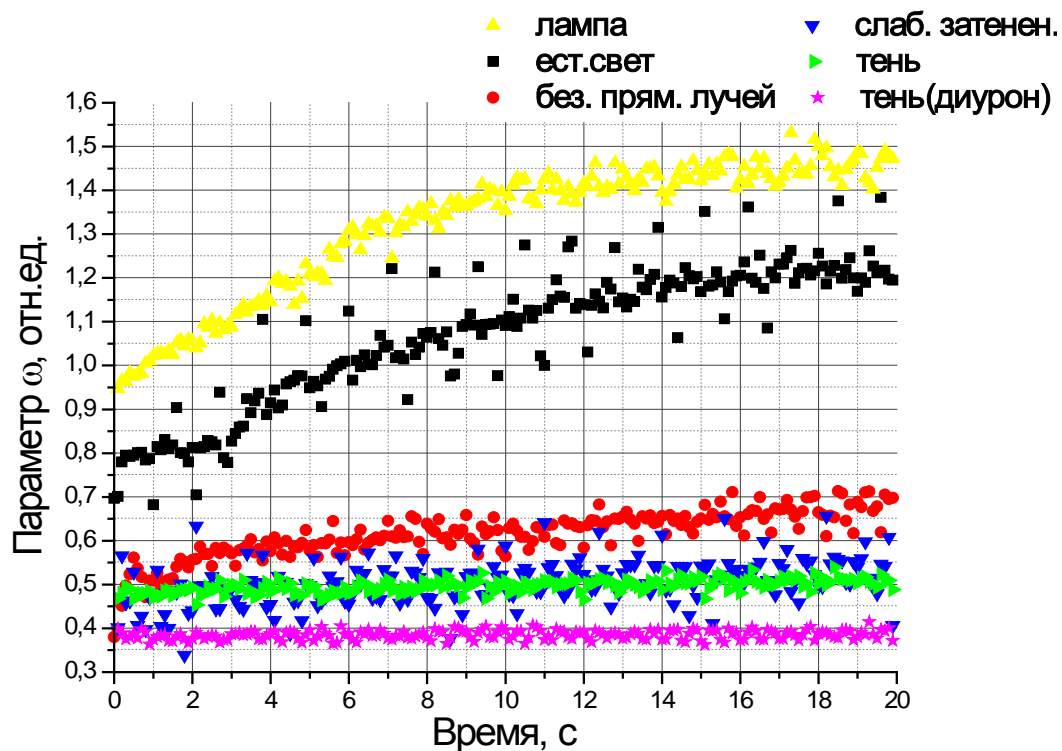


Рис. 20. Кинетики показателя  $\omega = F_{740}/F_{685}$  для листьев бобов, выращенных в разных условиях освещения.

	Интенсивность (лк)	Хл <i>a</i> (мг/г)	Хл <i>b</i> (мг/г)	Хл <i>a</i> + Хл <i>b</i> (мг/г)	$\omega$
Доп. освещение лампой	3000	0,93	0,49	1,42	1,45
Естественный свет	150-200	0,83	0,46	1,29	1,23
Отсутствие прямых солнечных лучей	30-40	0,36	0,17	0,53	0,68
Слабое затенение	20-30	0,29	0,14	0,43	0,55
Сильное затенение	1	0,24	0,1	0,34	0,5

Табл. 1. Изменение содержания хлорофилла и люминесцентного показателя  $\omega = F_{740}/F_{685}$  при изменении условий освещения растений (серия 1).

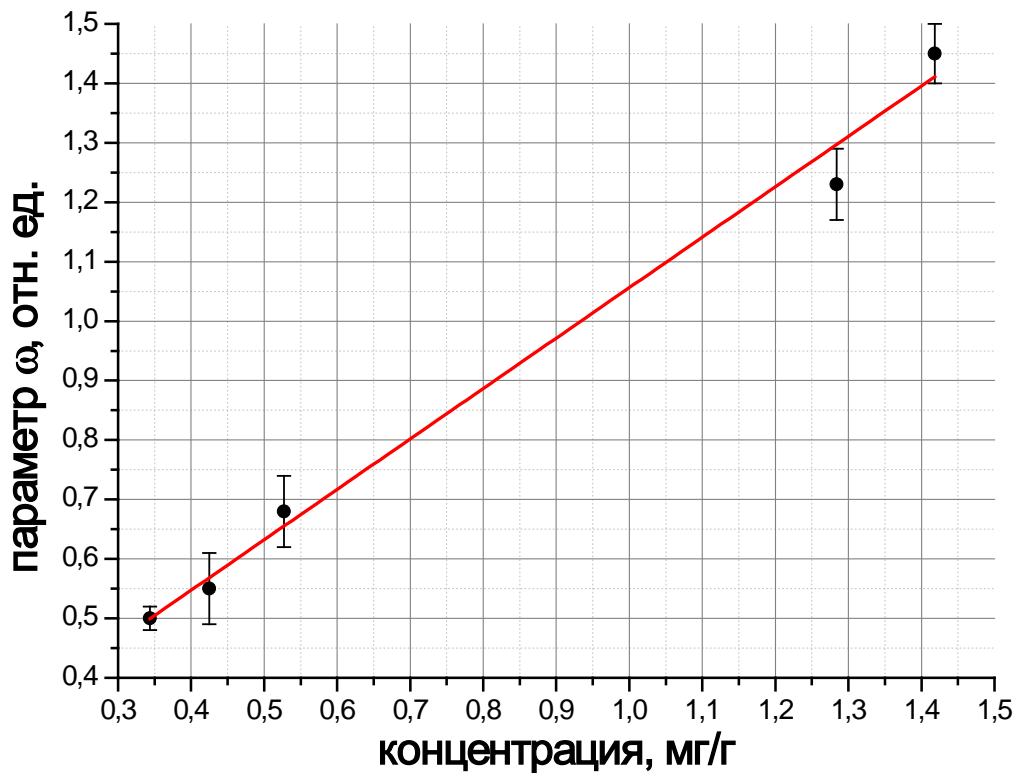


Рис. 21. Изменение показателя  $\omega = F_{740}/F_{685}$  в зависимости от содержания в листе хлорофилла (Хл *a* + Хл *b*, мг на 1 г сырой массы листа, серия 1)

	Интенсивность (лк)	Хл <i>a</i> (мг/г)	Хл <i>b</i> (мг/г)	Хл <i>a</i> + Хл <i>b</i> (мг/г)	$\omega$
Вариант 1	3000	0,73	0,39	1,12	1,3
Вариант 2	500-600	0,59	0,34	0,93	1,14
Вариант 3	150-200	0,44	0,25	0,69	0,75
Вариант 4	30-40	0,38	0,23	0,61	0,64
Вариант 5	20-30	0,33	0,21	0,54	0,57
Вариант 6	1	0,15	0,08	0,23	0,33

Табл. 2. Изменение содержания хлорофилла и люминесцентного показателя  $\omega = F_{740}/F_{685}$  при изменении условий освещения растений (серия 2).

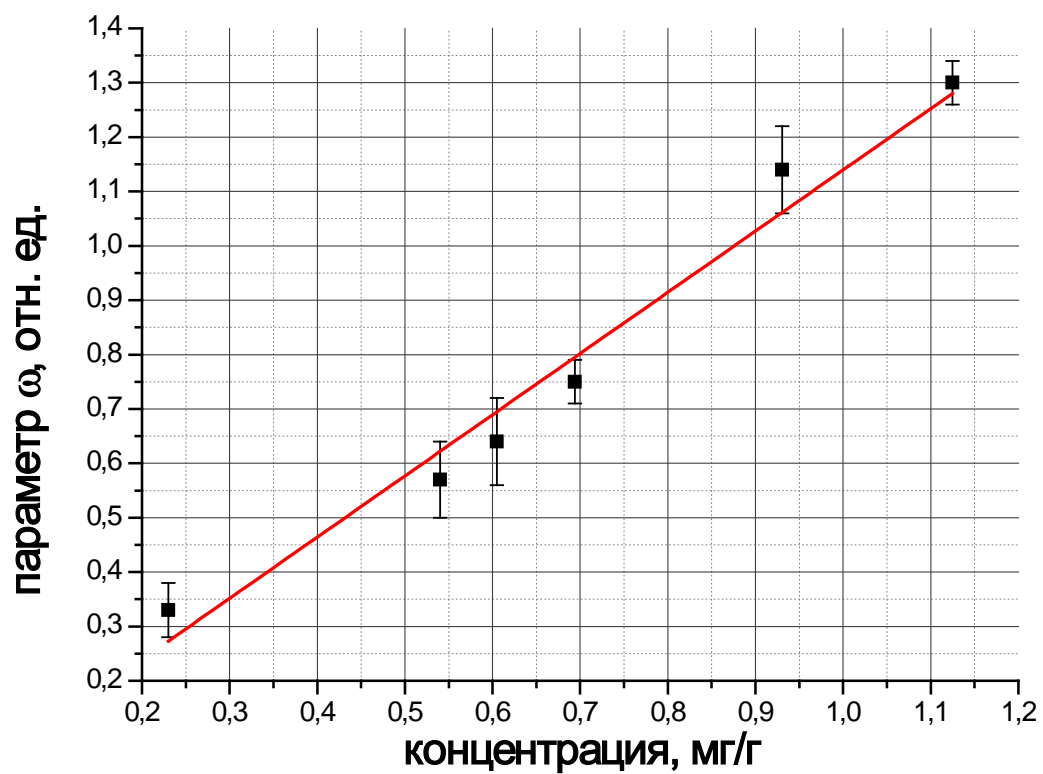


Рис. 22. Изменение показателя  $\omega = F_{740}/F_{685}$  в зависимости от содержания в листе хлорофилла ( $X_{л a} + X_{л b}$ , мг на 1 г сырой массы листа, серия 2)

## 5. Результаты и выводы

1. Исследованы спектры флуоресценции листьев растений, находящихся в различных физиологических условиях. Установлено, что при освещении листа, адаптированного к темноте, интенсивность флуоресценции в спектре уменьшается, а вклад длинноволновой полосы (параметр  $F_{740}/F_{685}$ ) увеличивается. Опыты с диуроном, фторидом натрия и ТМПД свидетельствуют о том, что этот эффект связан с работой цепи электронного транспорта в хлоропластах и перераспределением энергии возбуждения между фотосистемами.
2. При обработке проростков бобов хлоридом кадмия в концентрации  $10^{-6}$  и  $10^{-4}$  М тушение флуоресценции в красной и дальней красной области оказывается меньше, чем в контроле, что свидетельствует о снижении функциональной активности фотосинтетического аппарата растений.
3. Измерение спектров флуоресценции растений, обработанных физиологически активными веществами, позволило установить стимулирующее действие на фотосинтетический аппарат препарата феровит и ингибирующее действие гербицида чистолана.
4. Для растений, выращенных в различных условиях освещенности, выявлена линейная зависимость между параметром  $F_{740}/F_{685}$  спектра флуоресценции и содержанием хлорофилла в листьях.
5. Одновременная регистрация медленной индукции флуоресценции на длинах волн 740 и 685 нм позволяет рассчитать изменение показателя  $F_{740}/F_{685}$  в процессе освещения листа и, таким образом, изучить кинетику перераспределения энергии возбуждения между фотосистемами

В заключение, хотелось бы выразить благодарности лаборатории спектроскопии межмолекулярных взаимодействий в растворах органических соединений и сложных природных комплексах кафедры общей физики и лично кандидату физ.-мат. наук, доценту Виктору Илларионовичу Южакову и кандидату физ.-мат. наук, старшему преподавателю Светлане Викторовне Пацаевой за любезно предоставленную возможность проведения измерений на спектрофлуориметре Solar CM2203 и спектрофотометре АЕ-UV1602. А также Ирине Павловне Левыкиной за помощь в проведении экспериментов и своему научному руководителю доктору физ.-мат. наук, профессору Владимиру Александровичу Караваеву за многочисленные консультации.

## 6. Список литературы

1. Нобел П. Физиология растительной клетки. (Физико-химический подход). М.: Мир, 1973. 288 с.
2. Тихонов А.Н. Трансформация энергии в хлоропластах – энергопреобразующих органеллах растительной клетки // Соросовский образовательный журнал, 1996, №4, с. 24-32.
3. Рубин А.Б. Биофизика. Т. 2. М.: Кн. дом Университет, 2000. 468 с.
4. Junge W. Physical aspects of light harvesting, electron transport and electrochemical potential generation on photosynthesis of green plants // Encyclopedia of plant physiology. V. 5. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1977. P. 59-93
5. Рубин А.Б., Шинкарёв В.П. Транспорт электронов в биологических системах. М.: Наука, 1984. 320 с.
6. 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.
7. 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.
8. Полякова И.Б. Медленная индукция флуоресценции листьев растений при разной фотосинтетической активности: Дисс. ... канд. физ.-мат. наук. М.: МГУ, 2002. 146 с.
9. Тихонов А.Н. Регуляция световых и темновых стадий фотосинтеза // Соросовский образовательный журнал, 1999, №11, с. 8-15.
10. 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.
11. Клейтон Р. Фотосинтез. Физические механизмы и химические модели. М.: Мир, 1984. 352 с.
12. Твердислов В.А., Тихонов А.Н., Яковенко Л.В. Физические механизмы функционирования биологических мембран. М.: Изд-во Моск. университета, 1987. 200 с.
13. Lazar D. Chlorophyll *a* fluorescence induction. Biochim. Biophys. Acta, 1999, v. 1412, p. 1-28.
14. 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.
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 (9), 13 с.
  17. Karavaev V.A., Polyakova I.B., Solntsev M.K., Yurina T.P. Effect of various chemical agents on photosynthesis studied by the method of fluorescence induction // Journal of Luminescence, 1998, v. 76-77, p. 335 – 338.
  18. Глазунова С.А., Птушенко В.В., Гунар Л.Э., Караваев В.А., Солнцев М.К., Тихонов А.Н. Медленная индукция флуоресценции и CO<sub>2</sub>-обмен листьев бобов, обработанных экстрактом *Reynoutria sachalinensis* // Биофизика, 2009, №3, с.495-497.
  19. Гунар Л.Э. Мякиньюков А.Г., Караваев В.А. Применение люминесцентной диагностики для оценки действия ростстимулирующих веществ на урожайность и хозяйственно-ценные признаки зерновых культур // Доклады ТСХА, 2009, вып. 281, с.294–296.
  20. Корнеев Д.Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла. Киев: Альтепресс, 2002, 188 с.
  21. Четвериков А.Г. Принципы исследования реальных спектров флуоресценции фотосинтезирующих объектов // Биофизика, 1989, т.24, вып.1, с. 82-90.
  22. Szabo K., Lichtenthaler H.K., Kocsanyi Z., Richter P. A CCD-OMA device for the measurement of complete chlorophyll fluorescence emission spectra of leaves during the fluorescence induction kinetics // Radiat. And Environ. Biophys., 1992, v.31, №2, p.153-160.
  23. Кочубей С.М. Организация пигментов фотосинтетических мембран как основа энергообеспечения фотосинтеза. Киев.: Наук. думка, 1986. 188с.
  24. Литвин Ф.Ф. Биохимия и биофизика фотосинтеза. М.: Наука, 1963. 96 с.
  25. Гачковский В.Ф. «Красный сдвиг» и агрегированные формы хлорофилла // Физиология растений, 1986, т. 33, № 4, с. 661-670
  26. Асланиди К.Б., Шалапенюк А.А., Карнаухов В.Н., Берестовская Н.Г., Шавкин В.И. Метод определения функционального состояния растений по спектрам флуоресценции хлорофилла (техника биомониторинга). Пушино: ИЦБИ АН СССР, 1988. 43. с.
  27. D'Ambrosio N., Szabo K., Lichtenthaler H. K. Increase of the chlorophyll fluorescence ratio  $F_{690}/F_{735}$  during the autumnal chlorophyll breakdown //Radiat. And Environ. Biophys., 1992, v. 31, №1, p. 51-62.

28. Buschmann C. Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves. // *Photosynthesis Research*, 2007, №92, p. 261–271.
29. Заворуев В.В., Заворуева Е.Н., Шелегов А.В. Флуоресценция, возбуждаемая светом в диапазоне длин волн 380-540 нм, в листьях огурца в зависимости от времени вегетации и светового режима // *Биофизика*, 2000, т. 45, №4, с. 704-711
30. Паркер С. Фотолюминесценция растворов. М.: Мир, 1972, 510 с.
31. Бухов Н.Г. Старение листа. Выявление участков, лимитирующих фотосинтез, с помощью коэффициентов тушения флуоресценции хлорофилла и редокс-изменений P700 в листьях // *Физиология растений*, 1997, т. 44, с. 352-360.
32. Chow W.S., Telfer A., Chapman D.J., Burber J. State 1-State 2 transition in leaves and its association with ACP induced chlorophyll fluorescence quenching // *Biochem. Biophys. Acta*, 1981, v. 638, p. 60-68.
33. Караваев В.А., Белогрудов И.О., Кукушкин А.К. Медленная индукция флуоресценции и CO<sub>2</sub>-газообмен листьев бобов в присутствии диурона // *Биофизика*, 1989, т. 34, вып. 4, с. 710.
34. Караваев В.А., Шагурина Т.Л., Кукушкин А.К. Медленная индукция флуоресценции и перераспределение энергии возбуждения между фотосистемами // *Физиология растений*, 1987, т. 34, вып. 2, с. 221-228.
35. Караваев В.А., Баулин А.М., Гордиенко Т.В., Довыдьков С.А., Тихонов А.Н. Изменения фотосинтетического аппарата листьев бобов в зависимости от содержания тяжелых металлов в среде выращивания // *Физиология растений*, 2001, т. 48, №1, с. 47-54.
36. Малый практикум по физиологии растений / Под ред. Гусева М.В. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1982. 192 с.