

## ОПТИКА И СПЕКТРОСКОПИЯ

УДК 581.131

МЕДЛЕННАЯ ИНДУКЦИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ЛИСТЬЕВ БОБОВ  
ПРИ ИХ ОБРАБОТКЕ РАСТВОРАМИ  $\text{KN}_2\text{PO}_4$ 

С. А. Довыдьков, В. А. Караваев

(кафедра общей физики)

Изучено влияние раствора  $\text{KN}_2\text{PO}_4$  на индукционные изменения флуоресценции листа бобов при различных способах обработки растений: через корневую систему и при введении растворов в лист через жилку. Показано, что независимо от способа обработки максимальные изменения индукции флуоресценции имеют место при концентрации раствора  $\text{KN}_2\text{PO}_4$   $10^{-5}$ – $10^{-4}$  М. Исследована зависимость параметров медленной индукции флуоресценции от времени после обработки листа фосфатом. Установлена положительная корреляция между относительным тушением флуоресценции в ходе медленной индукции и стационарной скоростью фотосинтеза.

Индукционные изменения флуоресценции хлорофилла в листе при освещении адаптированных к темноте листьев светом средней интенсивности в значительной мере являются отражением процессов регуляции первичных стадий фотосинтеза как со стороны последующих стадий, так и со стороны метаболизма растения в целом (см. обзор [1]). Наблюдаемые в ходе так называемой медленной индукции флуоресценции (МИФ), характерные времена которой десятки секунд, изменения интенсивности флуоресценции позволяют изучить отклик растительных объектов на обработку физиологически активными веществами. В то же время при использовании веществ с известным избирательным действием на фотосинтез можно получить дополнительную информацию о тех механизмах, которые лежат в основе самой МИФ.

Цель данной работы заключалась в исследовании МИФ и фотосинтетической активности интактных листьев растений при их обработке дигидрофосфатом калия. Выбор  $\text{KN}_2\text{PO}_4$  обусловлен тем, что неорганический фосфат наряду с АМФ, АДФ и АТФ входит в аденилатную систему клетки и, таким образом, может оказывать влияние на многие метаболические процессы. Давно известно, что при дефиците минерального питания активность фотохимических стадий и углеродный метаболизм снижаются [2]. В связи с этим широко изучались ответные реакции растений на недостаток фосфата [2]. Однако остается открытым вопрос о том, чем лимитируется фотосинтез в этом случае: уменьшением образования АТФ из-за ограниченного поступления неорганического фосфата в хлоропласты или другими факторами. Изучение МИФ интактных листьев является весьма полезным, поскольку в основе этого явления, как предполагается, лежат процессы, непосредственно связанные с производством и расходом АТФ: во-первых, фосфорилирование белков светособирающего комплекса и связанное с ним перераспределение энергии возбуждения молекул хлорофилла между двумя фотосистемами, во-вторых, активация реакций углеродного метабо-

лизма вследствие наработки АТФ в первые минуты освещения [3].

## Методика

Объектом исследований служили листья бобов *Vicia faba* сорта "Русские черные", выращенные в лабораторных условиях с дополнительным освещением лампами накаливания общей мощностью 450 Вт с расстояния 0,3–0,4 м при смене периодов света и темноты, близкой к естественной. В работе использовали листья второго яруса 2–3-недельных проростков.

Для воздействия на индукцию флуоресценции использовали  $\text{KN}_2\text{PO}_4$  в виде водного раствора различной концентрации (разводили в дистиллированной воде). В растворах рН было естественным для листа (около 7). В контрольных опытах использовали водный раствор КСl различной концентрации и дистиллированную воду.

Флуоресценцию возбуждали с помощью осветительной системы диапроектора ЛЭТИ-55 и фильтра СЗС-22 с максимумом пропускания в области 450 нм. Интенсивность возбуждающего света составляла 20 Вт/м<sup>2</sup>. Флуоресценцию на длине волны 686 нм выделяли монохроматором от СФ-4 и регистрировали с помощью фотоумножителя ФЭУ-79, усилителя и прибора КСП-4. Интенсивность фотосинтеза измеряли манометрическим методом Варбурга [4].

Использовали следующую схему опыта: помещали лист в держатель, после этого его освещали в течение 30 с, затем 5 мин адаптировали к темноте, затем регистрировали МИФ.

В работе применяли три основных способа обработки растений растворами.

Первый способ заключался в том, что растения выращивали в почве и листья срезали непосредственно перед обработкой. Растворы исследуемых веществ или дистиллированную воду вводили в лист через центральную жилку при помощи медицинского шприца. Сразу после введения растворов изме-

ряли индукцию флуоресценции в соответствии с приведенной выше схемой.

При втором способе растения выращивали в почве и листья обрабатывали, не срезая со стебля, через жилку. По прошествии определенного количества дней (1–6) листья срезали и регистрировали МИФ.

При третьем способе растения обрабатывали растворами через корневую систему в условиях гидропоники. Методика их выращивания была следующей. Бобы замачивали в воде на 2 ч и затем высаживали в землю. Через 1 неделю, когда длина стержневого корня достигала 75–80 мм, бобы переносили в гидропонические условия и выращивали далее на водных растворах  $\text{KN}_2\text{PO}_4$  различных концентраций. Растворы меняли через 2–3 дня. В контроле бобы выращивали на воде.

Закономерности, полученные в работе, воспроизводились в нескольких сериях измерений, проведенных на растениях разных посадок.

## Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлена характерная кривая медленной индукции флуоресценции листа бобов, по-

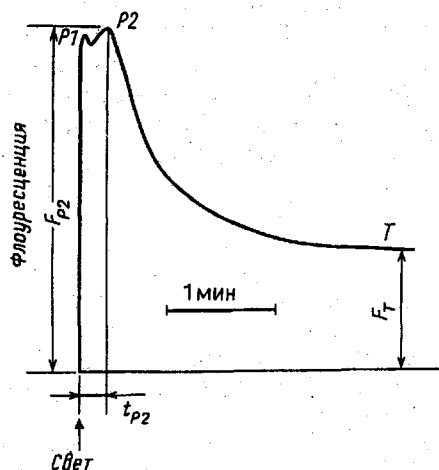


Рис. 1. Характерная кривая медленной индукции флуоресценции листа бобов (5 мин адаптации к темноте)

лученная после его 5-минутной адаптации к темноте. Предполагается [1], что высокие значения интенсивности флуоресценции в первые секунды освещения связаны со значительным восстановлением первичных акцепторов электронов фотосистемы 2. В последующий период начинают работать регуляторные механизмы, обеспечивающие оптимальное функционирование системы фотосинтетических реакций, и флуоресценция уменьшается. Эти механизмы, как было отмечено во введении, связаны с наработкой АТФ в ходе циклического и нециклического электронного транспорта, с диффузией фосфорилированных светособирающих комплексов в ту область хлоропласта, где концентрируются комплексы фотосистемы 1, а также с ускорением биохимических реакций цикла Кальвина при достижении оптимального соотношения НАДФН и

АТФ. В качестве основного параметра использовали  $F_{P2}/F_T$  — отношение интенсивности флуоресценции в максимуме второго пика  $F_{P2}$  к стационарному значению  $F_T$ . Этот параметр, очевидно, может служить количественным показателем упомянутых выше регуляторных изменений в фотосинтезе. Исследования МИФ [5, 6] показали, что он стабильно воспроизводится на разных листьях растений одной посадки при описанной в методике схеме опыта.

Введение в жилку листа раствора  $\text{KN}_2\text{PO}_4$  в концентрациях  $10^{-6}$ – $10^{-3}$  М приводит к немонотонному изменению параметра  $F_{P2}/F_T$  по сравнению с контролем (рис. 2). Концентрационная зависимость параметра имеет максимум при  $10^{-5}$ – $10^{-4}$  М; с увеличением концентрации до  $10^{-3}$  М отношение  $F_{P2}/F_T$  уменьшается до контрольного значения. Растворы  $\text{KCl}$  различных концентраций не оказывали существенного воздействия на МИФ (см. рис. 2). Наблюдаемый эффект воздействия  $\text{KN}_2\text{PO}_4$  можно объяснить влиянием вводимого неорганического фосфата на аденилатную систему хлоропласта, в результате чего количество синтезируемого АТФ увеличивается, и тушение флуоресценции оказывается более интенсивным. Интересно, что максимальный эффект воздействия  $\text{KN}_2\text{PO}_4$  наблюдается при концентрациях, примерно на порядок меньших известной из литературы средней концентрации неорганического фосфата в листе [9]. Очевидно, это связано с активным транспортом фосфата через мембраны хлоропластов и его высокой компарт-

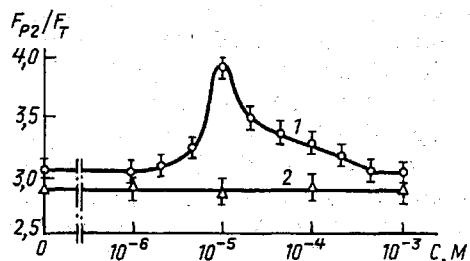


Рис. 2. Зависимость параметра  $F_{P2}/F_T$  от концентрации  $\text{KN}_2\text{PO}_4$  (1) и  $\text{KCl}$  (2)

ментацией внутри клетки. Уменьшение  $F_{P2}/F_T$  при больших концентрациях  $\text{KN}_2\text{PO}_4$  можно объяснить значительным фосфорилированием белков светособирающего комплекса за время от введения раствора в лист до измерения флуоресценции; в результате к моменту регистрации МИФ часть светособирающих комплексов оказывается фосфорилированной.

Исследования зависимости МИФ от времени, прошедшего с момента введения раствора  $\text{KN}_2\text{PO}_4$  в лист *in vivo*, т.е. без срезания его со стебля, показали, что при концентрации  $10^{-4}$  М максимальные значения  $F_{P2}/F_T$  наблюдаются через 3 дня после обработки листа (рис. 3). Для концентрации  $10^{-3}$  М достоверного максимума не наблюдалось (данные не приведены). В контрольных опытах использовали дистиллированную воду. Возрастание пара-

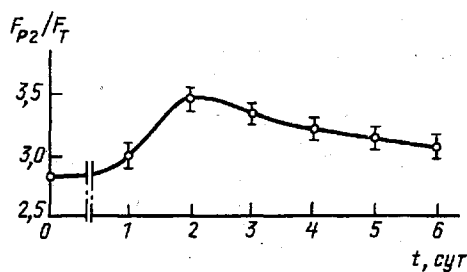


Рис. 3. Зависимость параметра  $F_{P_2}/F_T$  от времени после обработки листа раствором  $K_2H_2PO_4$  концентрации  $10^{-4}$  М

метра  $F_{P_2}/F_T$  со временем после обработки листа (рис. 3) можно объяснить постепенным усвоением фосфата растительной клеткой и адаптацией фотосинтетического аппарата листа к новым условиям; последующий спад, очевидно, связан с работой циркуляторной системы растения.

При выращивании растений на водных растворах  $K_2H_2PO_4$  в условиях гидропоники осуществлялась постоянная подпитка растения фосфатом и его содержание в клетке поддерживалось на одном и том же уровне. В этих условиях на протяжении всего времени выращивания растений максимальные значения  $F_{P_2}/F_T$  наблюдались для концентраций  $10^{-5}$ – $10^{-4}$  М. На рис. 4 представлены результаты одного из экспериментов, который проводился в течение всего светового дня. При этом абсолютные значения  $F_{P_2}/F_T$  для каждой из концентраций претерпевали определенные изменения (рис. 4), что соответствует известной суточной динамике активности фотосинтетического аппарата [8]. Вместе с тем соотношения между значениями  $F_{P_2}/F_T$  для разных концентраций практически не изменялись. Наибольшие значения параметра  $F_{P_2}/F_T$  наблюдались при тех же концентрациях, что и при введении раствора  $K_2H_2PO_4$  в жилку непосредственно перед регистрацией МИФ. Данный эффект наблюдался как для листьев II яруса, так и для листьев I и III ярусов. При этом существенных отличий в форме кривых МИФ листьев I и III ярусов мы не обнаружили.

Значения параметра  $F_{P_2}/F_T$  при обработке растений растворами  $K_2H_2PO_4$  через корневую систему положительно коррелировали со стационарной скоростью выделения  $O_2$  (см. рис. 4). Этот факт свидетельствует о регуляторной связи адапционных перестроек фотосинтетического аппарата листа с процессом фотосинтеза в целом.

Полученные результаты позволяют сделать

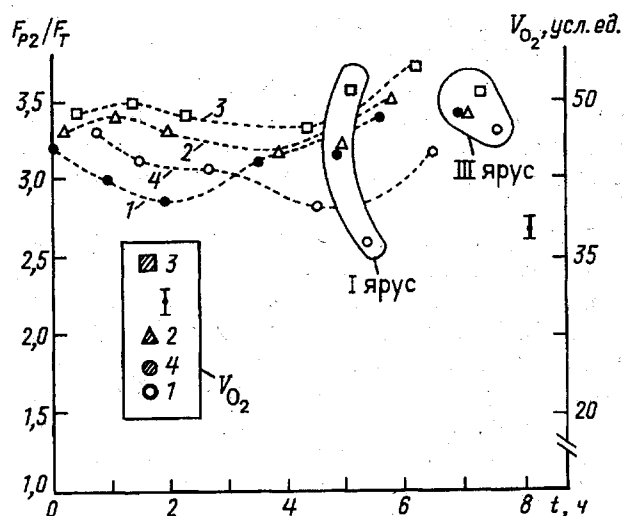


Рис. 4. Изменения параметра  $F_{P_2}/F_T$  и скорости выделения  $O_2$  при выращивании растений в условиях гидропоники. Момент  $t=0$  соответствует началу световой экспозиции растений. Концентрация раствора  $K_2H_2PO_4$  равна  $10^{-5}$  (2),  $10^{-4}$  (3) и  $10^{-3}$  М (4), кривая 1 –  $H_2O$

вывод о том, что поступление неорганического фосфата в хлоропласты при недостаточной минеральной подкормке может лимитировать фотосинтез, и о том, что существует некоторое оптимальное для регуляции фотосинтеза содержание неорганического фосфата в клетке. Кроме того, проведенная работа демонстрирует возможности простого с технической точки зрения метода МИФ для оценки состояния фотосинтетического аппарата *in vivo* в различных условиях.

#### Литература

1. Каранетян Н. В., Бухов Н. Г. // Физиология растений. 1986. 33, №5. С.1013.
2. Говинджи. Фотосинтез. М., 1987. Т.2. С.336.
3. Bradbury M., Baker N. R. // Biochim. et Biophys. Acta. 1984. 765. P.275.
4. Вознесенский В. Л., Заленский О. В., Семихатова О. А. Методы исследования фотосинтеза и дыхания растений. М.; Л., 1965.
5. Andreeva A. S. // Photosynthetica. 1983. 17, N4. P.515.
6. Шагурина Т. Л. Дис. ... канд. физ.-мат. наук. М. (МГУ), 1985.
7. Мецлер Р. Биохимия. М., 1980. Т.2.
8. Рабинович Е. Фотосинтез. М., 1959. Т.3.

Поступила в редакцию  
10.07.96