

5. Смирнов Б.М. // УФН. 1994. **164**. С. 665.
6. Каск Н.Е. // Письма в ЖЭТФ. 1994. **60**. С. 204.
7. Каск Н.Е., Федоров Г.М. // Квант. электроника. 1996. **23**. С. 1033.
8. Хлебцов Н.Т. // Опт. и спектр. 1993. **75**. С. 670.
9. Vicsek T., Family F. // Phys. Rev. Lett. 1984. **52**. P. 670.
10. Михайлов Е.Ф., Власенко С.С. // УФН. 1995. **165**. С. 263.
11. Игнатов А.М. // Физика плазмы. 1996. **22**, № 7. С. 648.
12. Чабра А., Герман Г., Ландау Д. // Фракталы в физике: Тр. VI Междунар. симп. по фракталам в физике. (Триест, Италия, 9–12 июля 1985 г.) / Под ред. Л.Пьетронеро и Э.Тозатти. М., 1988. С. 179.

Поступила в редакцию  
24.10.97

УДК 581.131

## ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА И АКТИВАТОРА ФОТОСИНТЕЗА НА ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЛИСТЬЕВ БОБОВ

В. А. Караваев, И. Б. Полякова, М. К. Солнцев, Т. П. Юрина,  
Е. А. Кузнецова<sup>\*)</sup>, А. М. Кузнецов

*(кафедра общей физики и кафедра биофизики физического факультета;  
лаборатория прикладной экологии биологического факультета)*

Исследована медленная индукция флуоресценции и термолюминесценции листьев бобов, обработанных ингибитором (диуроном) и активатором фотосинтеза. Установлена положительная корреляция между относительным тушением флуоресценции в ходе медленной индукции и стационарной интенсивностью фотосинтеза. Показано, что диурон смещает максимум термолюминесценции в сторону более низких, а активатор фотосинтеза — в сторону более высоких температур.

Установление взаимосвязи между фотосинтетической активностью и люминесцентными показателями листьев растений представляет собой важную и актуальную задачу. Ее решение позволит разработать комплекс достаточно простых методик, основанных на измерении люминесценции целых листьев, с помощью которых можно будет проводить экспресс-анализ физиологического состояния растения. В наших предыдущих работах была изучена взаимосвязь между фотосинтезом и люминесцентными показателями листьев в некоторых частных случаях: в присутствии гербицидов [1], антиоксидантов [2], антибиотиков [3] и в условиях различного минерального питания [4]. Цель данной работы — изучение медленной индукции флуоресценции (МИФ) и термолюминесценции (ТЛ) листьев бобов, обработанных веществами, оказывающими противоположное действие на фотосинтез: ингибитором фотосинтеза диуроном, используемым обычно в качестве гербицида, и специальным активатором фотосинтеза (АФ), предназначенным для повышения продуктивности растений.

### Методика

Растения бобов *Vicia faba* L. (сорт «Русские черные») выращивали в лабораторных условиях при естественном освещении. При измерениях преимущественно использовали листья второго яруса, считая снизу.

Диурон (дихлорфенилдиметилмочевина) разводили вначале в этаноле, а затем в дистиллированной воде. Содержание этанола в конечном водном растворе не превышало 1%. Растворы диурана вводили в лист через центральную жилку с помощью медицинского шприца, не отрывая лист от стебля, затем выдерживали лист на свету в течение одного часа, после чего его срывали и производили измерения МИФ, ТЛ или интенсивности фотосинтеза. Один час — это минимальное время, за которое межклеточное пространство полностью освобождалось от воды, и, таким образом, можно было проводить газометрические измерения. В тех случаях, когда определяли только люминесцентные показатели, раствор вводили в срезанный лист, а измерения МИФ и ТЛ проводили непосредственно после этого. Для контроля в лист вводили дистиллированную воду.

В качестве активатора фотосинтеза использовали специальный биопрепарат, разработанный в НПО «Биотехнология». Это водная суспензия кислотообразующих почвенных бактерий, обладающих способностью синтезировать цитокинины и другие стимулирующие рост вещества. Проростки бобов опрыскивали водной суспензией АФ дважды: первый раз — на стадии распутившихся листьев третьего яруса, второй раз — через 4–5 дней. Все измерения проводили через 3 дня после второй обработки.

<sup>\*)</sup> Московский государственный университет леса.

Перед измерениями МИФ лист помещали в держатель, освещали его в течение 30 с, затем 5 мин адаптировали к темноте, после этого регистрировали МИФ. Флуоресценцию возбуждали широкополосным синим светом интенсивностью  $45 \text{ Вт/м}^2$ , а наблюдали на длине волны  $686 \text{ нм}$ ; детали установки описаны в [1, 2].

Кривые ТЛ регистрировали на установке, описанной в работе [5]. Для стандартизации начальных условий образцы (высечки из листьев диаметром 1 см) вначале освещали через интерференционный фильтр с пропусканием  $725 \text{ нм}$  ( $\Delta\lambda = 5 \text{ нм}$ ) в течение 1 мин. Затем их адаптировали к темноте в течение 5 мин при комнатной температуре, после чего охлаждали до температуры облучения  $T_{\text{III}} = -30^\circ\text{C}$  и освещали полным спектром лампы накаливания в течение 3 мин. Такое время экспозиции было достаточным для «насыщения» интенсивности всех пиков ТЛ. Затем следовали охлаждение образца до  $-100^\circ\text{C}$  и нагрев со скоростью  $35 \text{ град/мин}$  в интервале температур регистрации  $-40 \div 40^\circ\text{C}$  и  $20 \text{ град/мин}$  в интервале  $40 \div 90^\circ\text{C}$ . Излучение регистрировали с помощью ФЭУ-79 и усилителя У5-9. Сигнал записывали на двухкоординатном потенциометре ПДС-021, на один из входов которого подавался сигнал с медь-константановой термопары.

Интенсивность фотосинтеза (скорость выделения  $\text{O}_2$  в расчете на единицу сырой массы листьев) определяли манометрическим методом Варбурга, как описано в работе [6]. Биохимические исследования проводили по методикам, указанным в [3]. Все закономерности, отмеченные в работе, воспроизводились в трех сериях экспериментов, проведенных на растениях разных посадок.

## Результаты и обсуждение

**1. Медленная индукция флуоресценции листьев бобов.** Характерная кривая МИФ представлена на рис. 1. В качестве основного параметра, как и ранее [1–4], использовано отношение  $F_M/F_T$ , где  $F_M$  — интенсивность флуоресценции в максимуме индукционной кривой,  $F_T$  — стационарный уровень флуоресценции. Предполагается, как и в работе [7], что высокие значения интенсивности флуоресценции в первые секунды освещения связаны с восстановлением первичных акцепторов электронов фотосистемы 2 (ФС2). В последующий период за счет ряда регуляторных механизмов достигается оптимальное функционирование системы фотосинтетических реакций и флуоресценция уменьшается. Эти механизмы связаны с наработкой АТФ в ходе циклического и нециклического электронного транспорта, перераспределением подвижных светособирающих комплексов между двумя фотосистемами, активацией ферментов биохимических реакций цикла Кальвина и др. [7]. Параметр  $F_M/F_T$  МИФ, очевидно, может служить количественным показателем всей совокупности этих регуляторных изменений.

Обработка листьев диуроном приводила к увеличению стационарного уровня флуоресценции и

уменьшению отношения  $F_M/F_T$  (рис. 2, кривые 3–5). Подобный эффект наблюдали и другие авторы [8, 9], он объясняется тем, что диурон блокирует нециклический электронный транспорт между фотосистемами. В наших опытах МИФ измеряли либо через 5 мин, либо через 1 ч после обработки листьев диуроном, при этом концентрационные зависимости для параметра  $F_M/F_T$  имели один и тот же вид (рис. 3, кривая 1). Это свидетельствует о быстром и прочном связывании гербицида с мембраной тилакоидов. Наряду с увеличением  $F_T$  и уменьшением  $F_M/F_T$  диурон вызывал уменьшение интенсивности фотосинтеза (рис. 3, кривая 2). Характерно, что действующие концентрации диуронона при этом практически совпа-

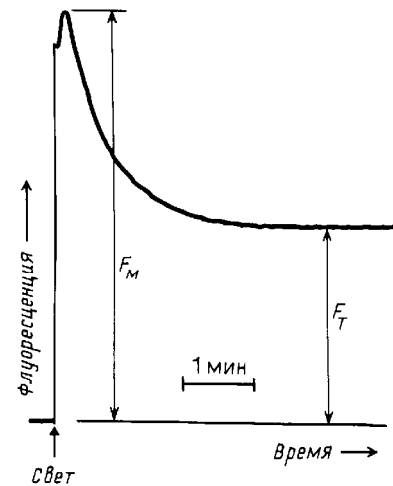


Рис. 1. Характерная кривая медленной индукции флуоресценции листа бобов

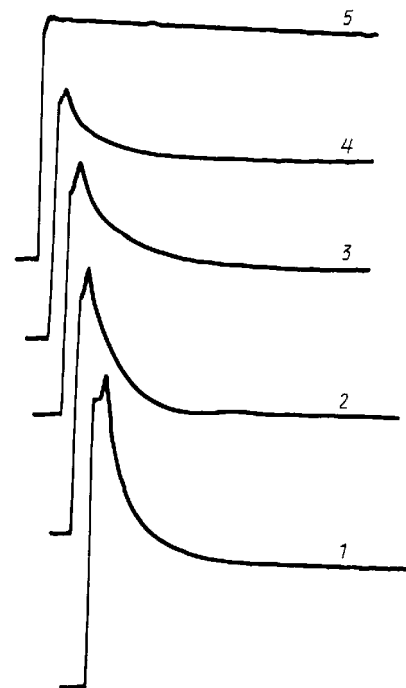


Рис. 2. Кривые медленной индукции флуоресценции листьев бобов, обработанных активатором фотосинтеза (1),  $\text{H}_2\text{O}$  (2) и диуроном (3 —  $5 \cdot 10^{-7} \text{ М}$ , 4 —  $10^{-6} \text{ М}$ , 5 —  $10^{-5} \text{ М}$ )

дали: 50%-й эффект наблюдался при концентрации около  $5 \cdot 10^{-7}$  М (рис. 3).

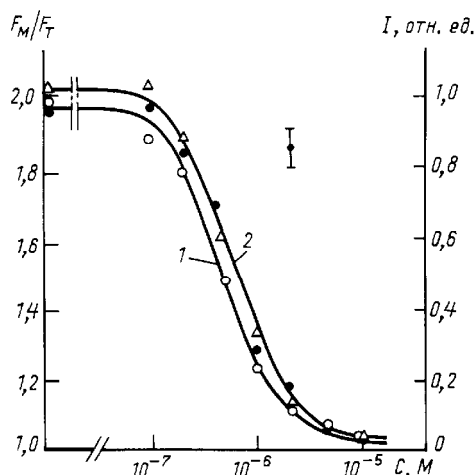


Рис. 3. Зависимость параметра  $F_M/F_T$  МИФ (1; ●, ○) и интенсивности фотосинтеза (2; △) от концентрации диурана. МИФ измеряли через 5 мин (●) и через 1 ч (○) после обработки листьев диураном

Обработка растений активатором фотосинтеза в отличие от обработки диураном приводила к увеличению уровня  $F_M$  (рис. 2, кривая 1). Уровень  $F_T$  при этом практически не изменялся, а отношение  $F_M/F_T$  возрастало (от 10% до 20% на растениях разных посадок). Подобный эффект АФ можно объяснить более активным синтезом АТФ в первые секунды освещения и как следствие — уменьшением градиента протонов  $\Delta(pH)$  на мембране тилакоидов: известно, что  $\Delta(pH)$  является тушителем флуоресценции хлорофилла [7, 10]. Ускорение фотофосфорилирования в свою очередь может быть связано с более быстрым освобождением АДФ и неорганического фосфата в ходе темновых метаболических реакций. О некоторых изменениях в клеточном метаболизме растений свидетельствуют результаты проведенных нами биохимических исследований. Так, в листьях бобов, обработанных АФ, наблюдалось увеличение содержания белка (на 10%) и общих фенолов (на 20%); активность фермента пероксидазы и общая реакционная активность водной вытяжки из листьев возрастали в среднем на 15%.

В опытах с АФ было также зарегистрировано увеличение интенсивности фотосинтеза (примерно на 20%), связанное, очевидно, с ускоренным синтезом АТФ и увеличением ферментативной активности, отмеченными выше. На рис. 4 приведены данные, полученные в одной из серий экспериментов с диураном и АФ. В контроле  $F_M/F_T \approx 2,0$ ; значение интенсивности фотосинтеза в этом случае условно принято за единицу. Полному ингибированию фотосинтеза, достигаемому при концентрации диурана  $10^{-5}$  М, соответствует  $F_M/F_T \approx 1,0$ . Все точки достаточно хорошо ложатся на прямую линию.

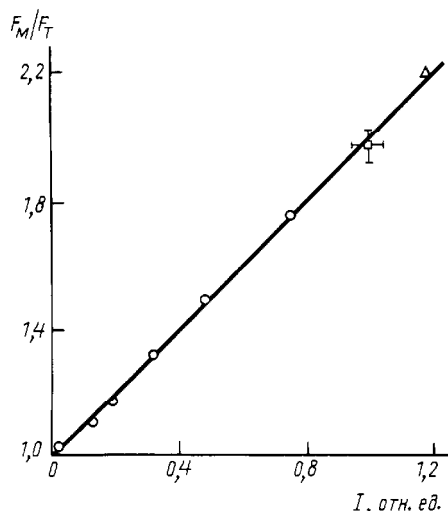


Рис. 4. Взаимозависимость между параметром  $F_M/F_T$  МИФ и интенсивностью фотосинтеза после обработки диураном (○) и активатором фотосинтеза (△); □ — контроль

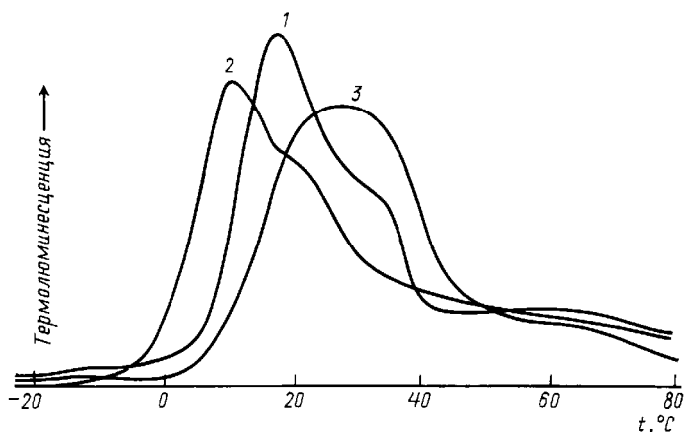


Рис. 5. Кривые термолюминесценции листьев бобов после обработки диураном (2) и активатором фотосинтеза (3); кривая 1 — контроль

Таким образом, параметр  $F_M/F_T$  МИФ положительно коррелирует с интенсивностью фотосинтеза как при ингибировании, так и при активации фотосинтеза. Этот показатель, очевидно, может быть использован при изучении влияния самых разных химических агентов на растительные объекты.

**2. Термолюминесценция листьев бобов.** Характерная кривая ТЛ контрольного листа представлена на рис. 5 (кривая 1). Обычно на кривой ТЛ выделяют три полосы [11]: полосу А ( $-20 \div 0^\circ\text{C}$ ), полосу В ( $0 \div 40^\circ\text{C}$ ) и полосу С ( $40 \div 80^\circ\text{C}$ ). Предполагается [11, 12], что полосы А и В возникают при рекомбинации так называемых S-состояний (компонентов водорасщепляющего комплекса различной степени окисленности) и электронов с первичного  $Q_A$  и вторичного  $Q_B$  хинонных акцепторов. Так, полоса А появляется при рекомбинации преимущественно  $S_4^+$  и  $Q_A^-$ , а полоса В — при рекомбинациях ( $S_3^+$  и  $Q_B^-$ ) и ( $S_2^+$  и  $Q_B^-$ ). Относительно природы полосы С существует целый ряд мнений [11]. Мы полагаем, что имеется «нефотосинтетическая компонента» этой по-

лосы, обусловленная взаимодействием с кислородом тех продуктов, которые появляются в результате деградации мембран при замораживании и нагревании фотосинтетических объектов [13].

При изучении действия диурона использовали его раствор с концентрацией  $10^{-5}$  М, при которой наблюдалось практически полное ингибирование фотосинтеза (см. рис. 3). Обработка листьев диуроном вызвала заметное смещение полосы  $B$  на  $7-8^{\circ}\text{C}$  в сторону более низких температур (рис. 5, кривая 2). Этот эффект можно объяснить тем, что диурон блокирует перенос электронов с первичного акцептора  $Q_A$  на вторичный акцептор  $Q_B$ , в результате чего при обратных реакциях рекомбинируют электроны преимущественно с  $Q_A^-$ , а для этого необходима меньшая энергия активации и соответственно более низкая температура нагрева.

После обработки растений активатором фотосинтеза полоса  $B$  смещалась на  $10-11^{\circ}$  в область более высоких температур (рис. 5, кривая 3). При этом полуширина кривой и вклад светосуммы (площади под кривой ТЛ) полосы  $B$  в общую светосумму практически не менялись. На основании этого и в соответствии с представлениями о природе полосы  $B$  [11, 12] можно сделать вывод, что АФ изменяет соотношение между  $S_3^+$ - и  $S_2^+$ -состояниями водорасщепляющего комплекса в сторону увеличения последних. Известно, что за низкотемпературную часть полосы  $B$  преимущественно ответственна рекомбинация пар  $S_3^+$  и  $Q_B^-$ , а за высокотемпературную — рекомбинация пар  $S_2^+$  и  $Q_B^-$  [14]. Действительно, электроны со вторичного хинонного акцептора  $Q_B^-$  рекомбинируют с «дырками» различной степени окисленности. И если в водорасщепляющем комплексе преобладают менее окисленные  $S$ -состояния, то максимум кривой ТЛ смещается в область более высоких температур, что и наблюдается в нашем случае.

Интересно, что обработка растений АФ практически не влияла на полосу  $C$  термолуминесценции. В соответствии с идеями, развиваемыми в [13], это может свидетельствовать о том, что структурные характеристики мембран хлоропластов в данном слу-

чае не менялись. Вместе с тем увеличение физиолого-биохимических показателей листьев под действием АФ, и в частности содержания фенолов, позволяет, кроме всего прочего, говорить о возможности использования АФ для повышения устойчивости растений к различным стрессовым воздействиям. В дальнейшем мы предполагаем проверить эту гипотезу в специальных экспериментах.

Авторы благодарят Е. В. Юрину и С. С. Мазурова за помощь в проведении экспериментов.

#### Литература

1. Караваев В.А., Шагурина Т.Л., Кукушкин А.К., Солнцев М.К. // Изв. АН СССР, сер. биол. 1985. № 3. С. 458.
2. Караваев В.А., Шагурина Т.Л., Кукушкин А.К., Солнцев М.К. // Физиология растений. 1985. 32, № 5. С. 884.
3. Юрина Т.П., Умнов А.М., Караваев В.А., Солнцев М.К. // Там же. 1989. 36, № 3. С. 581.
4. Караваев В.А., Солнцев М.К., Юрина Т.П. и др. // Там же. 1997. 44, № 1. С. 20.
5. Pliquet F., Solncev M.K. Thermolumineszenz Biologischer Objekte. Leipzig, 1978.
6. Малый практикум по физиологии растений / Под ред. М. В. Гусева. М., 1982.
7. Карапетян Н.В., Бухов Н.Г. // Физиология растений. 1986. 33, № 5. С. 1013.
8. Mochanty P., Govindjee // Photosynthetica. 1973. 7, № 2. P. 146.
9. Jennings R.C., Forti G. // Biochim. et Biophys. Acta. 1975. 396. P. 63.
10. Noctor G., Rees D., Yung A., Horton P. // Ibid. 1991. 1057. P. 320.
11. Иноу Й., Сибата К. Термолуминесценция фотосинтетического аппарата // Фотосинтез / Под ред. Говинджи. М., 1987. С. 680.
12. Ichikawa T., Inoue Y., Shibata K. // Biochim. et Biophys. Acta. 1975. 408. P. 228.
13. Солнцев М.К. // Журн. физ. химии. 1989. 63, № 7. С. 1959.
14. Солнцев М.К., Грибова З.П., Караваев В.А. // Физиология растений. 1989. 36, № 4. С. 686.

Поступила в редакцию  
14.11.97