

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^{*)}, 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 распустившихся листьев третьего яруса, второй раз — через 4–5 дней. Все измерения проводили через 3 дня после второй обработки.

^{*)} 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 Вт/м^2 , а наблюдали на длине волны 686 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 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°C и нагрев со скоростью 35 град/мин в интервале температур регистрации $-40 \div 40^\circ\text{C}$ и 20 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 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-

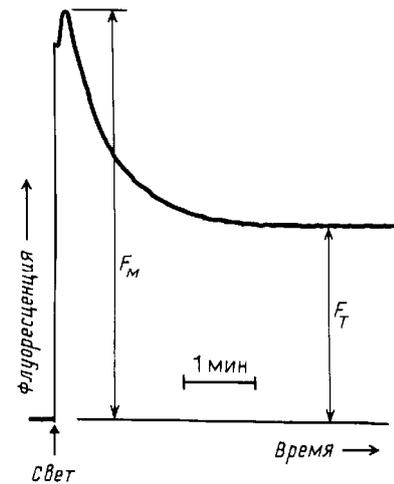


Рис. 1. Характерная кривая медленной индукции флуоресценции листа бобов

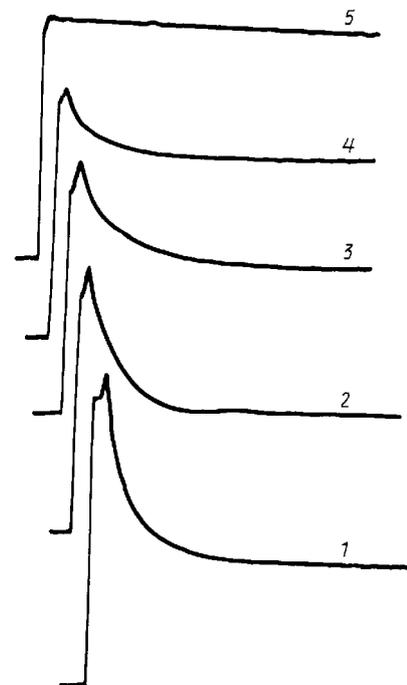


Рис. 2. Кривые медленной индукции флуоресценции листьев бобов, обработанных активатором фотосинтеза (1), H_2O (2) и диуроном (3 — $5 \cdot 10^{-7} \text{ М}$, 4 — 10^{-6} М , 5 — 10^{-5} М)

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

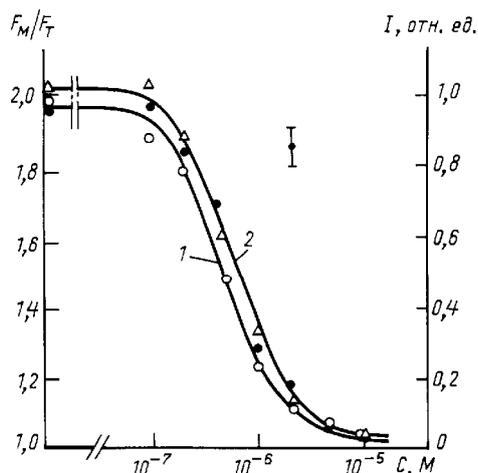


Рис. 3. Зависимость параметра F_M/F_T МИФ (1; ●, ○) и интенсивности фотосинтеза (2; △) от концентрации диурана. МИФ измеряли через 5 мин (●) и через 1 ч (○) после обработки листьев диураном

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.

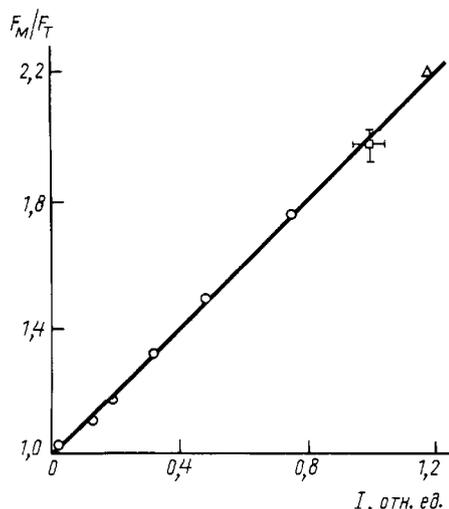


Рис. 4. Взаимозависимость между параметром F_M/F_T МИФ и интенсивностью фотосинтеза после обработки диураном (○) и активатором фотосинтеза (△); □ — контроль

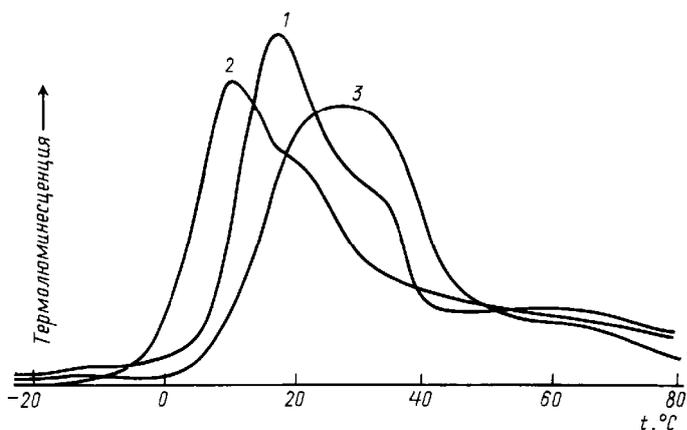


Рис. 5. Кривые термолюминесценции листьев бобов после обработки диураном (2) и активатором фотосинтеза (3); кривая 1 — контроль

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 диурина использовали его раствор с концентрацией 10^{-5} М, при которой наблюдалось практически полное ингибирование фотосинтеза (см. рис. 3). Обработка листьев диурином 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