

## БИОФИЗИКА И МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА

**Флуоресценция листьев бобов, выращенных при пониженной освещенности**О. А. Калмацкая<sup>a</sup>, И. П. Левыкина, С. В. Пацаева, В. А. Караваев, В. И. Южаков*Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет, кафедра общей физики. Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2.**E-mail: <sup>a</sup>kalmackaya@physics.msu.ru*

Статья поступила 02.06.2013, подписана в печать 09.09.2013.

Установлены закономерности в изменении формы спектров флуоресценции листьев бобов по мере понижения освещенности при выращивании растений и уменьшения содержания хлорофилла в листе. Показано, что в данных условиях эксперимента отношение  $\omega = F_{740}/F_{685}$  интенсивностей флуоресценции, регистрируемое по завершении индукционного процесса, линейно зависит от содержания хлорофилла в расчете на 1 г сырой массы листа.

*Ключевые слова:* хлорофилл, спектры флуоресценции, медленная индукция флуоресценции.

УДК: 277.3. PACS: 87.64.Ni, 87.15.Mi, 87.66.Sq.

**Введение**

Зависимость флуоресцентных показателей фотосинтезирующих объектов от широкого круга биотических и абиотических факторов делает их привлекательными для использования в целях мониторинга состояния фотосинтетического аппарата [1–3]. Установление взаимосвязи между люминесцентными и физиологическими характеристиками растений представляет собой важную и актуальную задачу.

Спектры флуоресценции хлорофилла зеленого листа, как правило, имеют два широких максимума в красной области спектра: один на длине волны 680–690 нм ( $F_1$ ), другой на длине волны 730–740 нм ( $F_2$ ) [4, 5]. Стационарное значение величины  $\omega = F_2/F_1$ , регистрируемое по завершении индукционного процесса, зависит от целого ряда факторов: характера минерального питания, концентрации  $\text{CO}_2$ , освещенности и длительности светового дня, влажности почвы и воздуха и др., причем оптимальным условиям развития растений всегда соответствуют максимальные значения  $\omega$  [5]. Кроме того, в ряде работ были зарегистрированы однонаправленные изменения этого показателя и содержания хлорофилла в листьях растений. Подобная корреляция была установлена на листьях огурца разных ярусов [6], растениях, выращенных в условиях различного минерального питания [7], в ходе осенней деградации хлорофилла [8] и ряде других случаев. Предполагается, что зависимость стационарного значения  $\omega$  от содержания хлорофилла в листе связана с эффектом перепоглощения более длинноволновыми формами хлорофилла излучения, испущенного его коротковолновыми формами [5].

В настоящей работе исследованы спектры флуоресценции листьев бобов, выращенных при пониженной освещенности и различающихся по содержанию хлорофилла. Кроме того, была использована методика одновременной регистрации индукционных изменений флуоресценции на длинах волн 685 и 740 нм (что соответствует максимумам в спектре флуоресценции листа), позволяющая изучить изменение отношения

$\omega = F_{740}/F_{685}$  при включении возбуждающего флуоресценцию света.

**1. Методика**

Проростки бобов *Vicia faba* L. (сорт «Русские черные») выращивали в пакетах с землей объемом 0.5 л в лабораторных условиях на разном расстоянии от окна, в том числе один вариант — с дополнительным освещением лампой ESB143-65 W,  $T_c = 6400$  K, продолжительность светового дня составляла около 9 ч. Всего в работе использовали шесть вариантов растений, выращенных при средней освещенности 5 ÷ 10, 20 ÷ 30, 30 ÷ 40, 150 ÷ 200, 500 ÷ 600 и 3000 лк. Освещенность измеряли в дневное время суток при помощи портативного цифрового люксметра Mastech MS6610. При измерениях флуоресценции использовали листья второго яруса двухнедельных проростков.

Спектры флуоресценции листьев растений измеряли на спектрофлуориметре Solar CM2203. Лист отделяли от стебля, помещали в держатель, освещали светом с длиной волны 450 нм, интенсивностью около 150 Вт/м<sup>2</sup> в течение 70 с для стандартизации условий эксперимента, затем выдерживали в темноте в течение 5 мин (этого времени было достаточно для наблюдения существенного индукционного эффекта), после чего включали свет с той же длиной волны и той же интенсивности и регистрировали ряд спектров флуоресценции в течение 10 мин; время регистрации одного спектра составляло около 60 с.

Медленную индукцию флуоресценции регистрировали на том же приборе одновременно на длинах волн 685 и 740 нм в течение 20 мин. Как и при измерении спектров флуоресценции, лист предварительно освещали светом с длиной волны 450 нм, интенсивностью около 150 Вт/м<sup>2</sup> в течение 70 с, затем адаптировали к темноте в течение 5 мин, как и в предыдущем случае, а затем включали свет и регистрировали флуоресценцию. Эти измерения позволили рассчитать изменение со временем отношения  $\omega = F_{740}/F_{685}$ , от момента включения возбуждающего света до достижения стационарного значения.

Содержание хлорофилла в листьях растений определяли, используя ацетоновые вытяжки, по методике, описанной в [9].

Полученные закономерности хорошо воспроизводились в двух сериях экспериментов, проведенных на растениях разных посадок в ноябре и начале декабря 2012 г.

## 2. Результаты и обсуждение

Проростки бобов, выращенные при разной освещенности, существенно отличались по внешнему виду. При относительно низкой освещенности ( $5 \div 200$  лк) растения имели удлиненные стебли и тонкие вытянутые листья с бледно-зеленой окраской. Содержание хлорофилла в листьях всех шести вариантов было разным, оно варьировало от 0.3 мг на 1 г сырой массы для освещенности  $5 \div 10$  лк до 1.3 мг/г для 3000 лк (см. ниже).

На рис. 1 представлены характерные спектры флуоресценции листьев бобов, выращенных при разной освещенности, на рис. 2 (кривые 1, 2) — характерные кривые медленной индукции флуоресценции (МИФ) на длинах волн 685 и 740 нм, соответствующих экстремальным значениям интенсивности в спектре. Для определения истинного соотношения  $F_{685}$  и  $F_{740}$  в спектрах 1 (рис. 1), полученных сразу после 5 мин темновой адаптации, были учтены индукционные эффекты, связанные с тем, что от момента включения возбуждающего флуоресценцию света до регистрации  $F_{685}$  и  $F_{740}$  проходит разное время. Для этого использовали кривые МИФ (рис. 2): определяли отношение максимальной интенсивности флуоресценции, достигаемой в первые секунды освещения, к значению, соответствующему времени регистрации максимума в спектре (20 с для  $F_{685}$  и 40 с для  $F_{740}$ ). Полученные отношения использовали для коррекции значений  $F_{685}$  и  $F_{740}$  в спектрах 1 (обозначены столбиками на рис. 1, а, б).

Согласно данным литературы [4], более коротковолновая флуоресценция ( $F_{685}$ ) связана с хлорофиллом, входящим в состав так называемой фотосистемы 2 (ФС2), а более длинноволновая ( $F_{740}$ ) — с хлорофиллом фотосистемы 1 (ФС1). Тушение флуоресценции (МИФ) при освещении адаптированного к темноте листа обычно подразделяют на фото- и нефотохимическое [10, 11]. Фотохимическое тушение флуоресценции связано с изменением окислительно-восстановительного состояния акцепторов электронов ФС2 и ФС1 и проявляется, как правило, при значениях интенсивности света меньше использованных в данной работе [11, 12]. Нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла, ассоциированного с ФС2, связано, во-первых, с образованием градиента протонов на мембране тилакоидов (так называемое энергетическое тушение) и, во-вторых, с перераспределением энергии возбуждения в пользу ФС1 (переходы «состояние 1 — состояние 2») [10, 11].

Образование  $\Delta pH$  на мембране тилакоидов (закисление внутритилакоидного пространства) приводит к протонированию специального белка PsbS и активации виолаксантинового цикла (преобразование пигмента каротиноидной природы виолаксантина в зеаксантин). В результате последующих структурных пере-

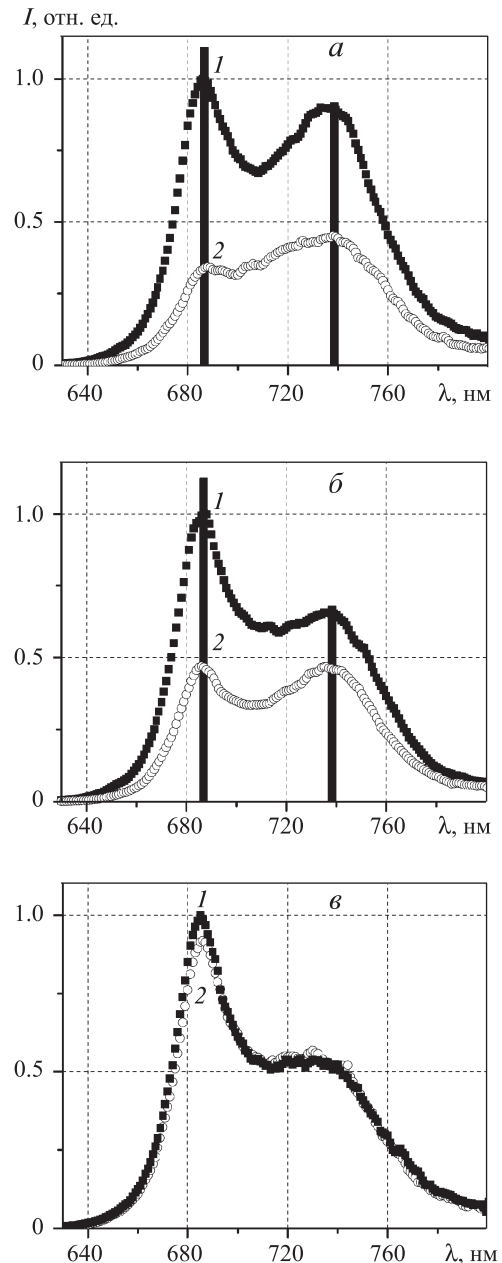


Рис. 1. Характерные спектры флуоресценции листьев бобов, выращенных при разной освещенности, полученные в одном из экспериментов: 3000 лк (а),  $500 \div 600$  лк (б),  $20 \div 30$  лк (в); 1 — после 5 мин темновой адаптации, 2 — после 10 мин освещения

строек в фотосинтетическом аппарате открывается канал тепловой диссипации энергии возбуждения молекул хлорофилла и флуоресценция уменьшается. Предполагается, что данный механизм нефотохимического тушения играет защитную роль, предохраняя фотосинтетический аппарат от повреждения на сильном свете и обеспечивая оптимальную скорость электронного транспорта между ФС (см. обзоры [3, 13–15]).

Оптимизация совместной работы двух ФС достигается посредством еще одного механизма, обеспечивающего перераспределение энергии возбуждения между ФС (переходы «состояние 1 — состояние 2»). Классический механизм этих изменений включает обратимое фосфорилирование специального светособираю-

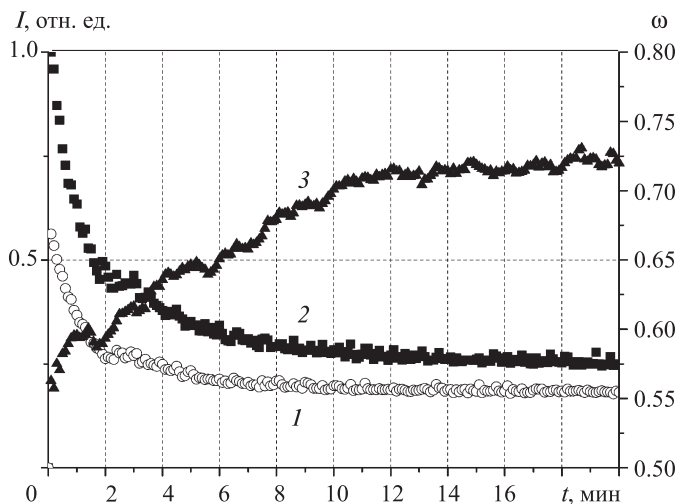


Рис. 2. Характерные кривые медленной индукции флуоресценции листьев бобов на длинах волн 740 нм (1) и 685 нм (2), полученные в одном из экспериментов, и соответствующие изменения параметра  $\omega = F_{740}/F_{685}$  (3). Освещенность при выращивании 150 ÷ 200 лк

Механизм положительной корреляции между стационарными значениями  $\omega = F_{740}/F_{685}$  и содержанием хлорофилла в листе, как уже упоминалось выше, может быть связан с эффектом перепоглощения более коротковолновой флуоресценции, испущенной хлорофиллом, ассоциированным с ФС2 [4]. В данных условиях эксперимента выявлена линейная зависимость  $\omega_s$  от содержания хлорофилла в расчете на сырую массу листа (рис. 3):  $\omega_s = k[\text{Chl}] + \omega_0$ ,  $\omega_0 < 0.05$ ,  $k \approx 1.13 \pm 0.07$  г сырой массы листа на 1 мг хлорофилла (коэффициент корреляции  $r = 0.986$ ,  $p > 0.95$ ).

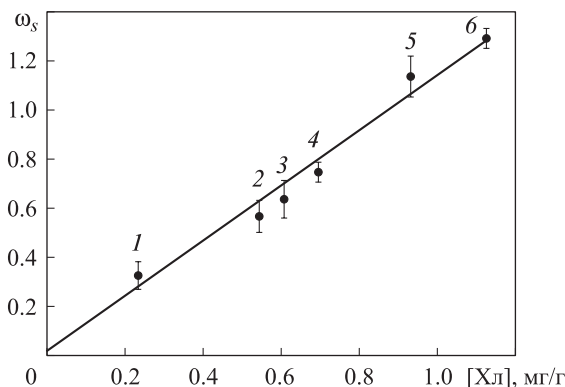


Рис. 3. Изменение стационарного значения показателя  $\omega_s = F_{740}/F_{685}$  спектров флуоресценции листьев бобов в зависимости от содержания хлорофилла (мг на 1 г сырой массы листа), лк: 1 — 5 ÷ 10, 2 — 20 ÷ 30, 3 — 30 ÷ 40, 4 — 150 ÷ 200, 5 — 500 ÷ 600, 6 — 3000

щего хлорофилл-белкового комплекса ССК2 и его перемещение между участками мембраны с разным содержанием комплексов ФС1 и ФС2. Фосфорилирование белков ССК2 осуществляется с помощью протеинкиназы, активность которой зависит от степени восстановленности пластохинонового пула переносчиков электронов между ФС, а дефосфорилирование — с помощью фермента фосфатазы [16–18].

Индукционные изменения флуоресценции проявляются в уменьшении интенсивностей  $F_{685}$  и  $F_{740}$  при переходе от спектра 1 к спектру 2 (рис. 1, а, б). Обращает внимание, что относительное тушение флуоресценции на длине волны 685 нм более сильное, чем на длине волны 740 нм (рис. 1, а, б; рис. 2, кривые 1, 2). Предполагается, что одной из возможных причин этого эффекта является упомянутое выше перераспределение энергии возбуждения между ФС в пользу ФС1 при фосфорилировании белков ССК2 [4]. В итоге отношение  $\omega = F_{740}/F_{685}$  после включения освещения постепенно увеличивается (рис. 2, кривая 3). Отметим, что по мере понижения освещенности при выращивании растений относительное тушение флуоресценции уменьшается, а при освещенности 20 ÷ 30 лк (рис. 1) и ниже практически отсутствует. Это может свидетельствовать о постепенном снижении фотосинтетической активности в расчете на хлорофилл по мере затенения растений [12, 19] — известно, что отсутствие тушения флуоресценции характерно для растений, обработанных ингибитором электронного транспорта диуроном при полном подавлении фотосинтетической активности [20]. Вместе с тем нельзя исключить снижения нефотохимического тушения флуоресценции по мере затенения растений за счет известного из литературы увеличения размеров светособирающей антенны в расчете на один реакционный центр [21].

По мере затенения растений и снижения содержания хлорофилла как исходные (непосредственно после включения возбуждающего света), так и стационарные значения  $\omega$  постепенно уменьшались (рис. 1).

### Заключение

Измерения спектров флуоресценции листьев бобов, выращенных при пониженной освещенности, свидетельствуют о высокой положительной корреляции между стационарными значениями  $\omega = F_{740}/F_{685}$ , достигаемыми в конце индукционного периода, и содержанием хлорофилла. Эти данные согласуются с результатами, полученными на других объектах и в других условиях изменения содержания хлорофилла в листе. Используемая в работе методика регистрации флуоресценции позволяет использовать несколько показателей, характеризующих функциональную активность фотосинтетического аппарата растений: 1) степень тушения флуоресценции после включения освещения; 2) изменение значений  $\omega = F_{740}/F_{685}$  в индукционном периоде и 3) стационарные значения  $\omega$ , коррелирующие с содержанием хлорофилла в листе.

### Список литературы

1. Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis / Ed. by G. C. Papageorgiou, Govindjee. Dordrecht, 2004.
2. Baker N.R. // Ann. Rev. Plant Biol. 2008. **39**. P. 89.
3. Demmig-Adams B., Cohu C.M., Müller O., Adams W.W. // Photosynth. Res. 2012. **113**. P. 75.
4. Buschmann C. // Photosynth. Res. 2007. **92**. P. 261.
5. Асланиди К.Б., Шалапенко А.А., Карнаухов В.Н. и др. Метод определения функционального состояния растений по спектрам флуоресценции хлорофилла (техника биомониторинга). Пушино, 1988.

6. *Заворуев В.В., Заворуева Е.Н., Шелегов А.В.* // Биофизика. 2000. **45**, № 4. С. 704.
7. *Кочубей С.М., Шадчина Т.М., Одинокий Н.С.* // Физиология и биохимия культурных растений. 1986. **18**. С. 35.
8. *D'Ambrosio N., Szabo K., Lichtenthaler H.K.* // Radiat. and Environ. Biophys. 1992. **31**. P. 51.
9. *Малый практикум по физиологии растений / Под ред. М.В. Гусева. М., 1982.*
10. *Krause G.H., Weis E.* // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1991. **42**. P. 313.
11. *Lazar D.* // Biochim. Biophys. Acta. 1999. **1412**. P. 1.
12. *Карavaев В.А.* Дисс. ... докт. физ.-мат. наук. М.: МГУ, 1990.
13. *Jahns P., Holzwarth A.R.* // Biochim. Biophys. Acta. 2012. **1817**. P. 182.
14. *Ruban A.C., Johnson M.P., Dufy C.D.P.* // Biochim. Biophys. Acta. 2012. **1817**. P. 167.
15. *Tikhonov A.N.* // Photosynth. Res. 2013. **116**, N 2–3. P. 511. <http://dx.doi.org/10.1007/s11120-013-9845-y>.
16. *Allen J.F.* // Biochim. Biophys. Acta. 1992. **1098**. P. 275.
17. *Minagawa J.* // Biochim. Biophys. Acta. 2011. **1807**. P. 897.
18. *Tikkanen M., Aro E.-M.* // Biochim. Biophys. Acta. 2012. **1817**. P. 232.
19. *Karavaev V.A., Polyakova I.B., Solntsev M.K., Yurina T.P.* // J. Luminescence. 1998. **76, 77**. P. 335.
20. *Карavaев В.А., Белогрудов И.О., Кукушкин А.К.* // Биофизика. 1989. **34**. С. 710.
21. *Kouril R., Wientjes E., Bultema J.B. et al.* // Biochim. Biophys. Acta. 2013. **1827**. P. 411.

### Fluorescence of bean leaves grown under low light

**O. A. Kalmatskaya<sup>a</sup>, I. P. Levykina, S. V. Patsaeva, V. A. Karavaev, V. I. Yuzhakov**

*Department of General Physics, Faculty of Physics, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia.*

*E-mail: <sup>a</sup>kalmackaya@physics.msu.ru.*

The regularities of spectra shape changes for chlorophyll fluorescence of bean leaves were identified under low light conditions of plants cultivation and decrease of chlorophyll concentration in the leaves. In these experimental conditions, the ratio of the peak intensities in the red spectral region  $\omega = F_{740}/F_{685}$  registered after the end of the induction period showed a linear dependence on the chlorophyll content per gram of fresh weight of the leaf.

*Keywords:* chlorophyll, fluorescence spectra, slow fluorescence induction.

*PACS:* 87.64.Ni, 87.15.Mi, 87.66.Sq.

*Received 2 June 2013.*

English version: *Moscow University Physics Bulletin* 6(2013).

### Сведения об авторах

1. Калмацкая Олеся Алексеевна — аспирант; тел.: (926) 017-66-33, e-mail: kalmackaya@physics.msu.ru.
2. Левыкина Ирина Павловна — мл. науч. сотрудник; тел.: (495) 939-41-88, e-mail: levykina@physics.msu.ru.
3. Пацаева Светлана Викторовна — канд. физ.-мат. наук, ст. преподаватель; тел.: (495) 939-36-90, e-mail: spatsaeva@mail.ru.
4. Карavaев Владимир Александрович — докт. физ.-мат. наук, профессор, профессор; тел.: (495) 939-41-88, e-mail: karavaev@phys.msu.ru.
5. Южаков Виктор Илларионович — канд. физ.-мат. наук, доцент, доцент; тел.: (495) 939-36-90, e-mail: spatsaeva@mail.ru.