

## АНАЛИЗ КИНЕТИКИ ИНДУКЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА С ПОМОЩЬЮ СПЕКТРАЛЬНОЙ МУЛЬТИЭКСПОНЕНЦИАЛЬНОЙ АППРОКСИМАЦИИ

© 2015 г. Т.Ю. Плюснина, С.С. Хрущев, Г.Ю. Ризниченко, А.Б. Рубин

Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/12

Поступила в редакцию 02.03.15 г.

Предложен метод анализа экспериментальных данных по кинетике индукции флуоресценции хлорофилла, основанный на получении спектральных характеристик сигнала кинетики индукции флуоресценции с помощью мультиэкспоненциального ряда и дальнейшем анализе частичных сумм полученного ряда. Метод позволяет выделить новые фазы в кинетике сигнала и вместо полуэмпирической оценки стадий, используемой в большинстве исследований, ввести более строгие и универсальные критерии оценки фаз индукционных кривых. Применение предлагаемого метода для анализа индукционных кривых, полученных на клетках водоросли *Chlamidomonas reinhardtii* при серном голодании, показывает его эффективность для обнаружения возникающих неявных фаз индукционной кривой, соответствующих ранним стадиям развития стресса.

*Ключевые слова:* фотосинтез, кинетика индукции флуоресценции хлорофилла, анализ индукционной кривой, мультиэкспоненциальная аппроксимация.

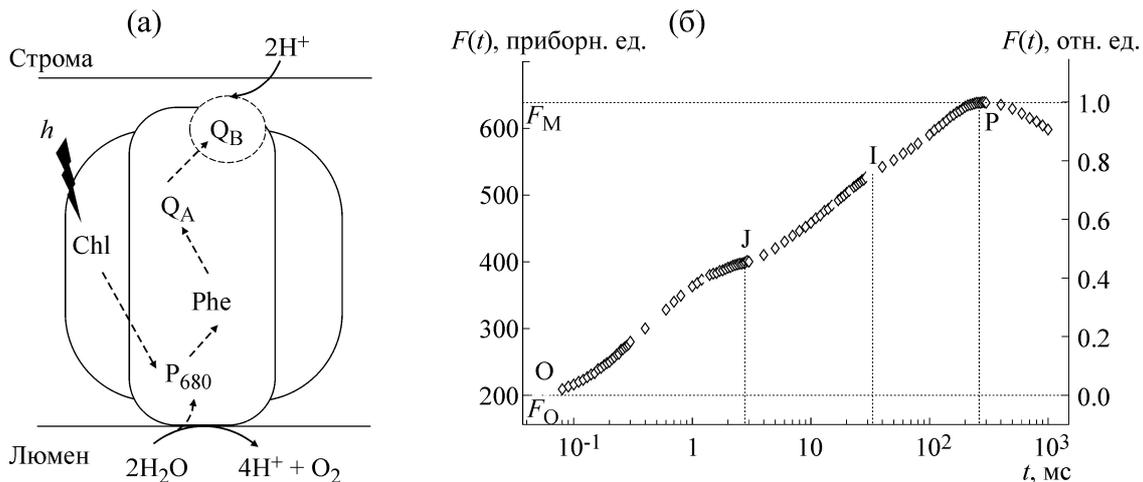
Исследование первичных реакций фотосинтеза относится к одной из наиболее развитых областей биофизики фотобиологических процессов. К первичным (световым) процессам фотосинтеза относят последовательность реакций разделения зарядов и переноса электронов при действии квантов света. Детально изучены молекулярный состав комплексов, участвующих в первичных реакциях переноса электронов, а также механизмы большинства реакций. Согласно современным представлениям, кванты света поглощаются молекулами хлорофилла антенны Chl (рис. 1а) и безызлучательно переносятся на пигмент реакционного центра фотосистемы II  $P_{680}$ , вызывая разделение зарядов и появление донорно-акцепторной пары  $P_{680}^+Phe^-$ .

Следующим акцептором электронов в цепи реакций является первичный хинон  $Q_A$ , который принимает один электрон и передает его на молекулу вторичного хинона (пластохинона)  $Q_B$ , способного принять два электрона (рис. 1а). Полное восстановление всех молекул переносчиков приводит к появлению так называемых «закрытых» реакционных центров и обратному потоку электронов. Возвращаясь на пигмент реакционного центра, часть потока энергии электронов высвечивается в виде флуоресценции, другая часть диссипирует в тепло.

Одним из важных биофизических методов, позволяющих оценивать эффективность первич-

ных реакций фотосинтеза, является измерение индукции флуоресценции хлорофилла *in vivo*. В основе данного метода лежит регистрация изменения интенсивности флуоресценции хлорофилла адаптированных к темноте образцов после включения постоянного возбуждающего света. Интенсивность флуоресценции изменяется от некоего исходного уровня  $F_0$  (после темновой адаптации растения) до максимального уровня  $F_M$  (так называемое быстрое нарастание кинетики флуоресценции, ~200–400 мс) (рис. 1б) и затем медленно (в течение ~ 1–10 мин) уменьшается до стационарного уровня.

График быстрого нарастания интенсивности флуоресценции, построенный в логарифмическом масштабе по времени, как правило, представляет собой трехфазную кривую, называемую, в соответствии с отображаемыми фазами, OJIP (рис. 1б). Характерные времена выделенных фаз соответствуют определенным группам реакций, происходящих на этих временах. Большинство исследователей сходится во мнении, что фаза OJ (0–2 мс) отражает кинетику фотовосстановления  $Q_A$  в активных центрах фотосистемы II и влияние на нее различных тушителей (молекул, за счет которых происходит уменьшение выхода флуоресценции, см. обзор [2]). Кинетика фаз J-I-P (2–30–200 мс) все еще вызывает различные дискуссии [3–6], однако в соответствии с утвердившейся теорией Дайсенса



**Рис. 1.** (а) – Схема переноса электронов в цепи переносчиков фотосистемы II (см. пояснения в тексте), (б) – типичная кривая световой индукции флуоресценции. Кривая получена для клеток *Chlamidomonas reinhardtii*, выращенных в нормальных условиях [1].

и Свисса [7] считается, что восстановление  $Q_A$  продолжается до тех пор, пока не будет достигнут максимум  $F_M$ , при этом на форму кривой могут оказывать влияние реакции восстановления пула пластохинонов, а также восстановление последующих переносчиков в электрон-транспортной цепи и электрохимический потенциал на тилакоидной мембране. Максимальный уровень  $F_M$  соответствует максимальному восстановлению  $Q_A$ . По амплитудам и характерным временам фаз индукции флуоресценции можно оценивать эффективность электронного транспорта в фотосистеме II, а также влияние ингибиторов и мутаций.

Анализ экспериментальных данных по быстрой стадии индукции флуоресценции широко используется исследователями для оценки активности фотосинтетического аппарата и влияния на него внешних факторов. Так, в работах [8–10] анализ индукционных кривых использовали для изучения устойчивости растений к недостатку влаги и выявления генотипов с повышенной засухоустойчивостью. Авторы работ [11–14] исследовали механизмы адаптации к различным условиям освещения. В работе [15] оценивали оптимальные условия роста лишайников, используемых в качестве биомаркеров при загрязнении окружающей среды при проведении биомониторинга.

Анализ кинетики индукции флуоресценции хлорофилла долгое время проводили простым визуальным сравнением контрольной кривой с кривыми, полученными при различных воздействиях. В дальнейшем на основе теории энергетических потоков была предпринята попытка формализации анализа кинетики индукции

флуоресценции и предложен метод расчета характеристик этих потоков (JIP-тест, [16,17]) по амплитудам фаз индукционной кривой. Используя значения амплитуд, определяемые в фиксированные моменты времени (2 мс для OJ и 30 мс для JI), а также наклон кривой в начальный момент времени, можно рассчитать различные характеристики, определяющие эффективность первичных реакций переноса электронов. Предложенный Штрассером метод выделения фаз индукционных кривых является полуэмпирическим, что существенно ограничивает область его применения, поскольку характерные времена индивидуальных фаз индукционной кривой не являются фиксированными и зависят как от объекта исследования, так и от условий эксперимента.

Попытки уйти от полуэмпирического определения фаз индукционной кривой были предприняты в работах [18–20], где авторы использовали представление кинетики индукции флуоресценции в виде суммы двух или трех экспонент. С помощью такого разложения были оценены амплитуды и константы скоростей стадий OJ, JI и IP нарастания индукции флуоресценции хлорофилла.

Теоретическую основу для представления кинетики индукции флуоресценции хлорофилла в виде суммы экспоненциальных функций дают математические модели первичных процессов фотосинтеза, представляющие собой системы обыкновенных дифференциальных уравнений, линейных относительно переменных состояний фотосистемы II [21–25]. При построении таких моделей используется описание переходов между состояниями фотосистемы II реакциями

первого порядка. Из теории дифференциальных уравнений известно, что решением такой системы будет являться сумма экспоненциальных функций. Число компонентов этой суммы будет соответствовать числу элементарных реакций. В работах [26,27] нами было показано, что детальную модель переноса электронов в фотосистеме II, состоящую из большого числа уравнений, можно редуцировать, сгруппировав реакции по характерным временам и используя приближение квазиравновесных состояний. Предложенный подход позволяет объяснить тот факт, что визуально различимыми являются только три фазы индукции флуоресценции, несмотря на большое число последовательных элементарных реакций переноса электрона.

Суммируя вышесказанное, можно видеть, что в современных методах анализа индукционных кривых используется либо полуэмпирическая оценка амплитуд фаз кривой (JIP-тест), определяемых как значения интенсивности флуоресценции в фиксированные моменты времени, либо представление кривых в виде суммы трех экспонент для оценки характерных времен и амплитуд фаз кривой. Такое представление обусловлено в основном традиционным выделением в кинетике индукции флуоресценции трех фаз, обнаруживаемых визуально в полупологарифмическом по времени масштабе. В то же время современные представления об устройстве и функционировании фотосинтетического аппарата указывают на существование большего числа процессов, чем число фаз, явно обнаруживаемых на индукционных кривых. Предметом настоящей работы является разработка метода выделения процессов, оказывающих существенное влияние на ход кривой индукции флуоресценции, на основе математического анализа индукционной кривой. Нами предлагается подход, позволяющий с помощью спектральной мультиэкспоненциальной аппроксимации найти и охарактеризовать дополнительные фазы кривой индукции флуоресценции. Характерные времена этих фаз могут быть сопоставлены с конкретными процессами переноса электрона в фотосинтетической электрон-транспортной цепи. Изменение характерных времен и амплитуд этих фаз при изменении условий эксперимента может дать важную информацию о регуляции первичных процессов фотосинтеза.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Представление кинетики индукции флуоресценции в виде суммы экспоненциального ряда с фиксированными временами.** Как указывалось

выше, различные состояния комплексов фотосистемы II могут быть описаны системой линейных дифференциальных уравнений, решение которой можно представить в виде суммы экспоненциальных функций. Вообще говоря, число экспоненциальных функций определяется количеством уравнений. Параметр времени, входящий в показатель экспоненты, представляет сочетание констант скоростей элементарных реакций [20,26]. Характерные времена переноса электронов в первичных реакциях фотосинтеза могут различаться на пять порядков, от микросекунд до сотен миллисекунд [2]. Значительное отличие характерных времен первичных реакций фотосинтеза позволяет выделить отдельные фазы на индукционной кривой. Каждая из фаз, отражающаяся на индукционной кривой, указывает группу реакций с соответствующими характерными временами.

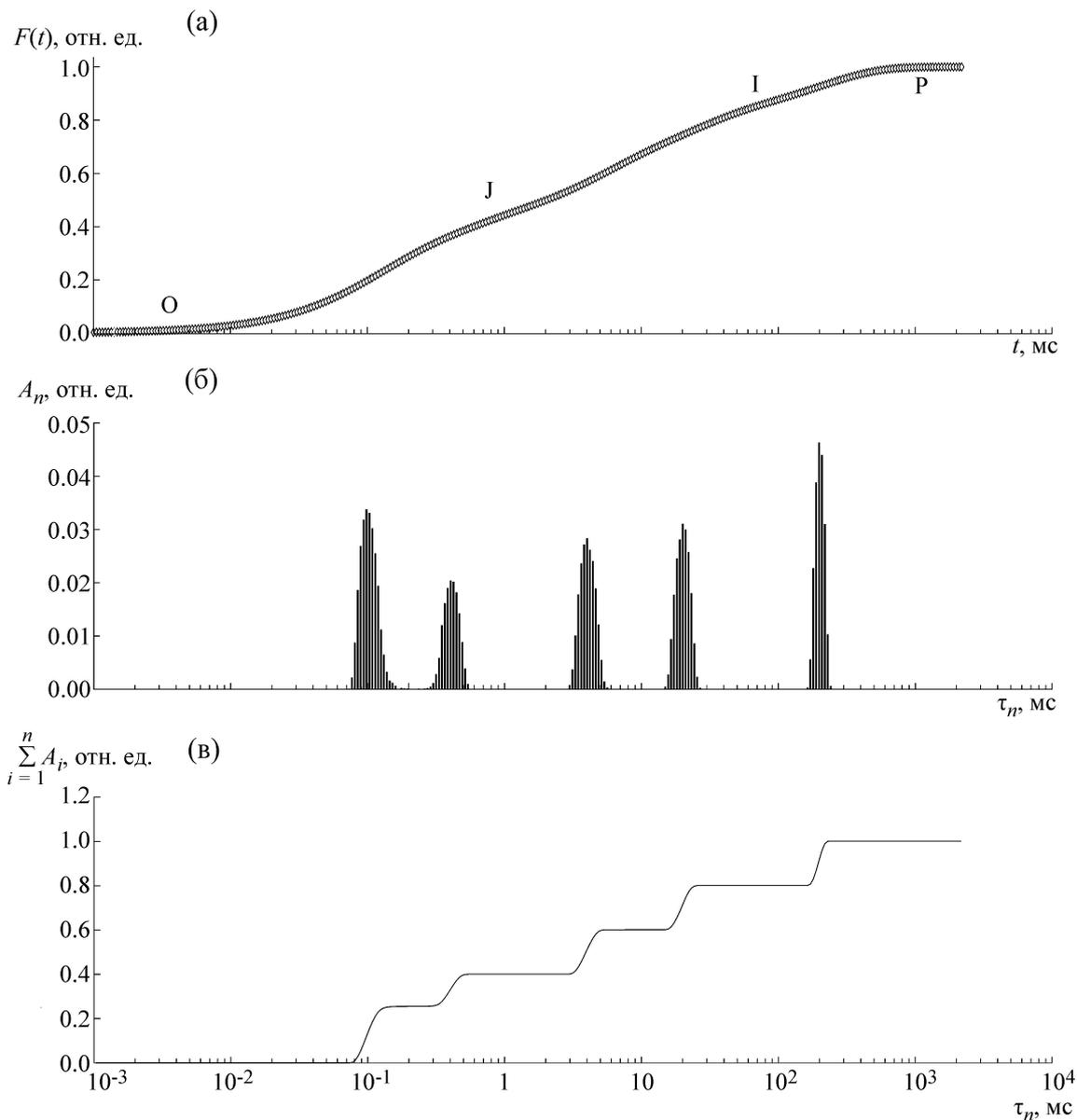
Одним из наиболее распространенных способов анализа сигнала в самых разных областях исследований является его представление в виде спектра. Широко применяются такие методы, как Фурье-анализ, преобразование Лапласа, использующие экспоненциальные функции с комплексными переменными. Поскольку мы исходим из модели, решение которой представляет сумму экспоненциальных функций, для проведения спектрального анализа будем аппроксимировать кинетику индукции флуоресценции мультиэкспоненциальным рядом с фиксированными характерными временами  $\tau_n$ :

$$F(t) = F_0 + \sum_{n=1}^N A_n (1 - e^{-t/\tau_n}), \quad (1)$$

где  $F_0$  – минимальное значение на кривой индукции флуоресценции  $F(t)$ ,  $A_n$  отражает вклад  $n$ -й экспоненты с характерным временем  $\tau_n$  в общий сигнал,  $t$  – время.

Характерные времена показательных функций  $A_n(1 - e^{-t/\tau_n})$  выбираются на фиксированной логарифмической сетке с шагом  $k_{\text{step}}$ :  $\tau_{n+1} = k_{\text{step}} \cdot \tau_n$ . Для возможности учета процессов на малых временах начальное время  $\tau_0$  задается как  $\tau_0 = 0,1\tau_{\text{ex}}$ , где  $\tau_{\text{ex}}$  – время первого измерения в экспериментально полученных данных. В качестве конечного времени  $\tau_{\text{max}}$  используется время достижения максимального значения  $F(t)$ .

Результат аппроксимации входного сигнала  $F(t)$  уравнением (1) представляет собой набор амплитуд  $A_n$ , соответствующих выбранным фиксированным временам  $\tau_n$  (амплитудный спектр, рис. 2б). Для случая, когда входной сигнал представляет собой сумму экспоненциальных функций, спектр имеет вид отдельных



**Рис. 2.** Иллюстрация предлагаемого подхода для анализа кинетики индукции флуоресценции с помощью модельных кривых, имитирующих экспериментальные кривые индукции флуоресценции. На всех графиках используется логарифмический масштаб времени. (а) – Модельная кривая, построенная по формуле:  $F(t) = \sum_{n=1}^5 A_n(1 - e^{-t/\tau_n})$ , параметры указаны в табл. 1. (б) – Спектр амплитуд  $A_n(\tau_n)$ , полученный при аппроксимации кривой  $F(t)$  рядом из 300 экспонент  $\sum_{n=1}^{300} A_n(1 - e^{-t/\tau_n})$ , где  $\tau_0 = 0,001$ , а каждое последующее значение  $\tau$  было рассчитано по формуле  $\tau_{n+1} = k_{\text{step}} \cdot \tau_n$ ,  $k_{\text{step}} = 1,05$ . (в) – Частичные суммы ряда  $\sum_{i=1}^n A_i$ , построенные на каждом шаге по времени  $\tau_n$ .

полос, каждая из которых включает одну или несколько существенно отличающихся от нуля амплитуд с близкими характерными временами. Общее число этих полос равно числу экспонент, образующих входной сигнал, а их характерные времена близки к характерным временам экс-

понент, составляющих входной сигнал. Ширина полосы определяется свойствами выбранного численного метода аппроксимации и наличием шума во входном сигнале. Характерные времена отдельных стадий переноса электрона в электрон-транспортной цепи фотосинтеза значи-

тельно различаются, и полосы хорошо разрешимы. Для оценки характерного времени фазы используется взвешенное среднее характерных времен экспонент, составляющих полосу.

Сумма амплитуд  $A_n$  всех экспонент, составляющих каждую отдельную полосу, определяет амплитуду соответствующей фазы входного сигнала. Для визуализации результатов аппроксимации и идентификации отдельных фаз индукции флуоресценции по экспериментально полученным данным удобно использовать график зависимости частичных сумм  $\sum_{i=1}^n A_i$  от соответствующих значений  $\tau_n$ . Такой график (рис. 2в) представляет собой ступенчатую функцию, позволяющую оценить амплитуды и характерные времена этих фаз. Частичные суммы амплитуд, рассчитанные на каждом шаге сетки, будут давать общую картину наиболее значимых вкладов экспоненциальных функций, соответствующих различным фазам кривой индукции флуоресценции.

Предложенный метод анализа данных индукции флуоресценции был реализован в виде модуля для пакета ruPhotoSyn, разработанного авторами [28]. Для решения уравнения (1) использовался алгоритм Левенберга–Марквардта, реализованный в пакете SciPy.

**Построение модельных кривых и получение кривых индукции флуоресценции.** Для иллюстрации предлагаемого метода анализа кинетики индукции флуоресценции хлорофилла были использованы два типа кривых: 1) модельные кривые, сгенерированные по заданным функциям; 2) кривые, полученные в результате измерения сигнала индукции флуоресценции для клеток водорослей *Chlamydomonas reinhardtii*, выращенных в нормальных условиях и в условиях минерального голодания.

Модельные кривые были получены с помощью стандартного пакета MS Excel, в котором задавался вид функции, выбирался шаг по времени и генерировался дискретный ряд значений, удовлетворяющих исходной функции.

Экспериментальные кривые для клеток водорослей *C. reinhardtii* были получены в работе [1]. Клетки выращивали фотогетеротрофно на триацетат-фосфатной среде, рН 7,0 при 25°C и освещенности 100 мкЕ м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>. Затем клетки трижды осаждали и ресуспендировали в среде без серы либо в полной среде (контроль), после чего инкубировали при аналогичных условиях в течение 72 ч. Флуоресценцию хлорофилла регистрировали с помощью флуорометра РЕА (Hansatech, United Kingdom) при возбуждении

красным светом с длиной волны 650 нм и интенсивностью 3000 мкЕ м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Анализ модельных данных.** Для демонстрации возможностей метода рассмотрим сначала пример анализа данных, имитирующих реальный сигнал, но полученных с помощью заранее известной функции, в качестве которой будем использовать сумму пяти экспонент с заданными параметрами (рис. 2а).

Как видно, на графике этой функции в логарифмическом масштабе по времени (рис. 2а) визуально можно выделить три фазы, сходные с обычно наблюдаемыми на экспериментальных кривых фазами ОJ, JI и IP.

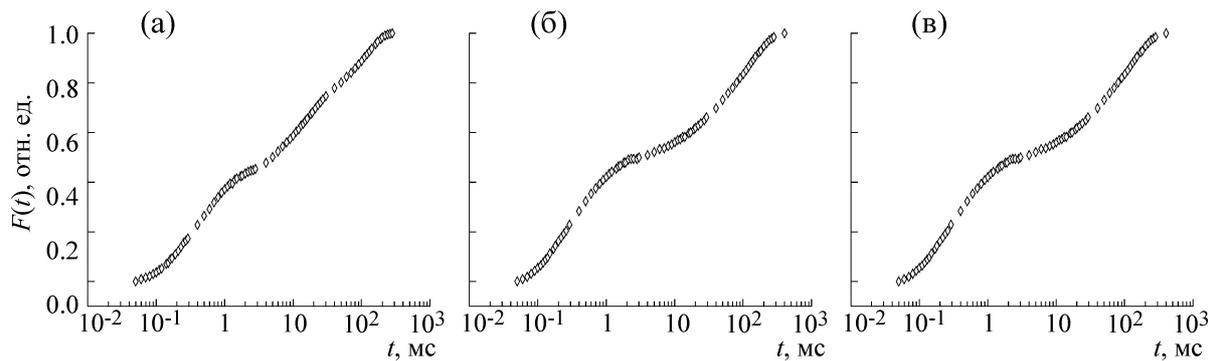
Будем аппроксимировать заданную модельную кривую  $F(t)$  (рис. 2а) суммой  $N$  экспоненциальных функций (1) при  $F_0 = 0$ , т.е.  $F(t) = \sum_{n=1}^N A_n(1 - e^{-t/\tau_n})$ , в которых параметры

$\tau_n$  выбраны на логарифмической сетке  $\tau_n$  и фиксированы, а амплитуды  $A_n$  оцениваются по методу наименьших квадратов. В результате аппроксимации получим амплитудный спектр – набор амплитуд  $A_n(\tau_n)$ , распределенный по выбранным фиксированным временам  $\tau_n$  (рис. 2б). Полученный спектр имеет пять хорошо разрешенных отдельных полос с временами, близкими к характерным временам исходно заданных функций. Величины амплитуд вне полос приближаются к нулю и на графике визуально не обнаруживаются.

Для полученного ряда амплитуд построим частичные суммы: для каждого времени  $\tau_n$  будем складывать все амплитуды, находящиеся на интервале от 0 до  $\tau_n$ . В результате получим график с пятью явно выраженными «ступеньками» (рис. 2в). Высоты полученных ступенек в точности соответствуют амплитудам экспонент, составляющих модельную кривую. Каждая ступенька соответствует отдельной фазе.

Характерные времена выявленных фаз оценим с помощью взвешенного среднего характерных времен экспонент, составляющих полосу. Рассчитанные времена и амплитуды хорошо согласуются с параметрами функции, использованной для получения модельной кривой (табл. 1).

Как можно видеть, предложенный метод анализа позволяет обнаружить фазы, неразличимые на исходном графике. Благодаря тому, что характерные времена фаз кривой значительно отличаются, наибольший вклад от ка-



**Рис. 3.** Кривые индукции флуоресценции, полученные для суспензии клеток микроводорослей *Chlamidomonas reinhardtii* [1]. Кривые нормированы на  $(F_M - F_0)$ . (а) – Клетки выращены в нормальных условиях (контроль), (б) – клетки выращены в условиях голодания по сере в течение 48 ч, (в) – клетки выращены в условиях голодания по сере в течение 72 ч.

ждой экспоненты приходится на разные интервалы времени. Отметим, что метод позволяет выделить фазы с характерными временами, отличающимися в несколько раз, тогда как визуально выделяются фазы с характерными временами, различающимися на порядок и больше. Плато каждой ступеньки, начинающейся со времени  $\tau_i$ , соответствует интервалу, на котором происходит уменьшение вклада в кинетику нарастания функции  $F(t)$  экспоненциальных функций с характерными временами, меньшими  $\tau_i$ , и увеличение вклада функций с характерными временами, большими  $\tau_i$ . Проведенный анализ модельной кривой подтверждает возможность использования предлагаемого метода для идентификации отдельных фаз индукции флуоресценции и оценки их параметров.

**Анализ кинетики индукции флуоресценции хлорофилла зеленой водоросли *Chlamidomonas reinhardtii*.** Рассмотрим применение предлагаемого метода для анализа реальных данных по индукции флуоресценции (рис. 3).

На рис. 3 представлены данные, полученные на клетках водоросли *Chlamidomonas reinhardtii*, выращенных в нормальных условиях (контроль, рис. 3а) и в условиях минерального голодания по сере (рис. 3б,в) [1]. Для клеток, выращенных в нормальных условиях, авторы выделяют три хорошо выраженные фазы ОJ, JI и IP, тогда как в условиях минерального голодания пере-

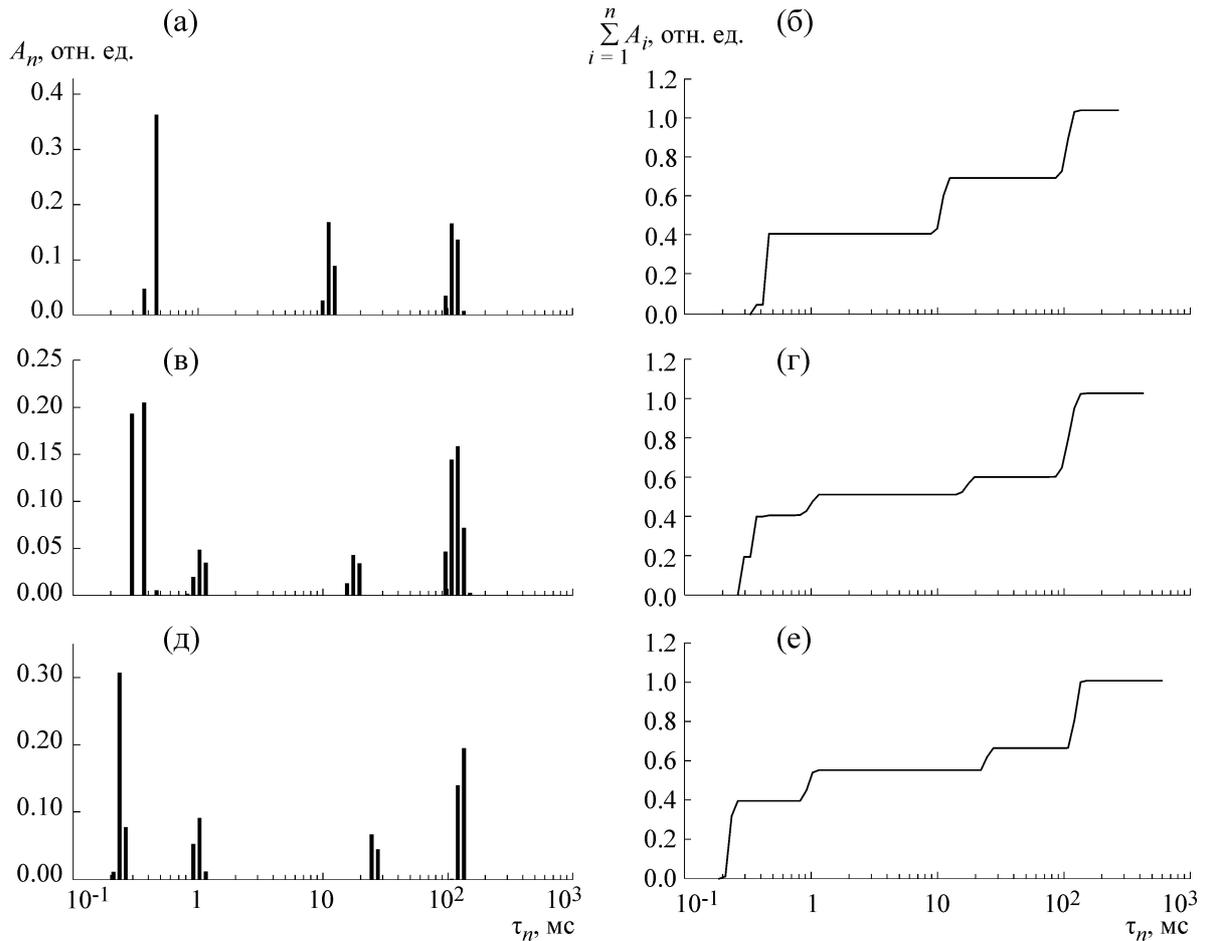
ход между фазами JI и IP визуально не различим.

Нами был проведен спектральный анализ данных, результаты которого представлены на рис. 4 и в табл. 2.

Анализ данных с помощью спектра подтверждает, что индукционная кривая, полученная в контроле, имеет три типичные фазы (рис. 3а). В процессе голодания амплитуда фазы JI значительно снижается, что приводит к визуальному слиянию фаз JI и IP (рис. 4г,е). Кроме того, возникает дополнительная полоса амплитуд в спектре (рис. 4в,д). Для данных, полученных после 48 ч голодания, фаза ОJ с характерным временем  $\tau_1 = 0,46$  мс разделяется на две фазы с временами  $\tau_{1,1} = 0,33$  мс и  $\tau_{1,2} = 1,0$  мс (рис. 4в, табл. 2). После 72 часов голодания полоса с характерным временем  $\tau_{1,2} = 0,33$  мс сдвигается в сторону более коротких времен,  $\tau_{1,2} = 0,24$  мс (рис. 4д, табл. 2), что свидетельствует об увеличении вклада быстрых процессов, протекающих на временах порядка 0,2–0,3 мс, роль которых становится более значимой в условиях минерального голодания. Таким образом, предложенный метод позволил провести более детальный анализ экспериментальных данных и выявить, помимо традиционно обнаруживаемых ОJIP-фаз индукции флуоресценции, новую фазу, связанную, по-видимому, с процессами, происходящими при голодании.

**Таблица 1.** Параметры модельной кривой и результаты ее спектрального анализа

Параметр	$A_1$	$A_2$	$A_3$	$A_4$	$A_5$	$\tau_1$	$\tau_2$	$\tau_3$	$\tau_4$	$\tau_5$
Заданное значение	0,25	0,15	0,20	0,20	0,20	0,1	0,4	4,0	20,0	200,0
Рассчитанное значение	0,259	0,141	0,201	0,199	0,200	0,10	0,41	4,06	20,02	200,3



**Рис. 4.** Спектры и частичные суммы, полученные при аппроксимации кривой  $F(t)$  рядом из 120 экспонент  $\sum_{n=1}^{120} A_n(1 - e^{-t/\tau_n})$ , где  $\tau_0 = 0,005$ , а каждое последующее значение  $\tau$  рассчитано по формуле  $\tau_{n+1} = k_{step} \cdot \tau_n$ ,  $k_{step} = 1,1$ . (а, в, д) – Спектры амплитуд, полученные при фитировании кривых  $F(t)$  (рис. 3а–в). (б, г, е) – Частичные суммы амплитуд, построенные на каждом шаге по времени для кривой  $F(t)$  (рис. 3а–в). (а, б) – контроль, (в,г) – голодание в течение 48 ч, (д, е) – голодание в течение 72 ч.

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Широкое применение методов регистрации индукционных кривых флуоресценции хлорофилла для решения фундаментальных и прикладных задач требует развития новых методов анализа кинетики индукции флуоресценции.

Предложенный в данной работе подход позволяет расширить возможности современных методов анализа индукционных кривых путем аппроксимации исследуемой кривой суммой экспонент, найти их минимальное число, достаточное для хорошего совпадения экспериментальных данных с аппроксимирующей кривой,

**Таблица 2.** Результаты спектрального анализа экспериментальных кривых из работы [1]

	ОJ		JI	IP
Контроль	$A_1 = 0,41$ $\tau_1 = 0,46$		$A_2 = 0,28$ $\tau_2 = 11,3$	$A_3 = 0,34$ $\tau_3 = 110,2$
Голодание 48 ч	$A_{1.1} = 0,39$ $\tau_{1.1} = 0,33$	$A_{1.2} = 0,12$ $\tau_{1.2} = 1,0$	$A_2 = 0,09$ $\tau_2 = 18,0$	$A_3 = 0,42$ $\tau_3 = 114,7$
Голодание 72 ч	$A_{1.1} = 0,40$ $\tau_{1.1} = 0,24$	$A_{1.2} = 0,16$ $\tau_{1.2} = 1,0$	$A_2 = 0,11$ $\tau_2 = 25,7$	$A_3 = 0,34$ $\tau_3 = 128,7$

оценить число фаз кривой, их амплитуды и характерные времена.

Обычно применяемый визуальный анализ кривых индукции флуоресценции позволяет выделить отдельные фазы, характерные времена которых существенно различаются (как минимум на порядок). Как показано на модельной кривой, предлагаемый метод позволяет разделить значительно более близкие фазы, характерные времена которых отличаются всего лишь в четыре–пять раз. Оценка амплитуд фаз, полученная по частичным суммам спектрального ряда, с большой точностью отражает величину амплитуд экспонент, составляющих модельную кривую, и позволяет судить об относительной доле каждой фазы в общей кинетике кривой.

В результате анализа реальных данных, полученных на клетках *C. reinhardtii*, удалось обнаружить формирующуюся в процессе серного голодания дополнительную, визуально не различимую, фазу на кривой в интервале времени от 0,2 до 0,3 мс. В литературе описано появление К-пика на участке OJ (~0,3 мс) при тепловом стрессе (например, при инкубации листьев при 45° и выше) [29–32], который связывают с инактивацией кислородвыделяющего комплекса. Замедление восстановления  $P_{680}^+$  в результате инактивации кислород-выделяющего комплекса приводит к тушению флуоресценции и появлению максимума на индукционной кривой. В работах [20,33,34] делается предположение, что при серном голодании также может возникать К-фаза, однако максимум на индукционной кривой не всегда выражен явно. Выделение дополнительной полосы, появляющейся после 48 ч голодания, позволяет предположить, что процессы с характерными временами порядка 0,3 мс начинают играть важную, возможно лимитирующую, роль в общем электронном транспорте в фотосистеме II. Предлагаемый метод позволил обнаружить тушение флуоресценции с такими характерными временами на самых ранних стадиях стресса, когда вызванные стрессом изменения не привели к появлению явного К-пика. Анализ серии последовательных кривых позволяет наблюдать динамику возникающих эффектов.

В данной работе мы не ставили задачу точной идентификации обнаруженных дополнительных фаз, поскольку для корректного сопоставления наблюдаемых фаз с реальными процессами фотосинтеза необходим анализ достаточно большого числа индукционных кривых. Для получения спектральных характеристик кривой мы исходили из модели линейного переноса электронов и вытекающей из него ап-

проксимации мультиэкспоненциальным рядом. Конечно, реальные кривые представляют собой более сложные зависимости. Такие процессы, как экситонный перенос возбуждения в димерах реакционных центров фотосистемы II и изменение электрохимического градиента на тилакоидной мембране, могут приводить к отклонению от экспоненциальной зависимости. Однако, несмотря на искажение «идеальной» формы кривой, метод позволяет выделить визуально не обнаруживаемые фазы кривой индукции флуоресценции хлорофилла, определить их амплитуды и характерные времена, которые далее можно сопоставить с известными процессами, возникающими в ответ на изменение условий эксперимента. Высокая чувствительность метода в выявлении неявных фаз с достаточно близкими характерными временами предполагает эффективность его применения для обнаружения ранних стадий развития стресса в растительных организмах.

Авторы выражают свою благодарность А.А. Волгушевой и Т.К. Анталу за предоставление экспериментальных данных индукции флуоресценции для клеток *C. reinhardtii* и их обсуждение, А.В. Шаповалову и А.И. Лобанову за обсуждение предлагаемого в работе метода и ценные советы по его программной реализации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант 14-04-00326-а.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. А. Волгушева, Г. П. Кукарских, Т. К. Антал и др., Биофизика **53** (5), 787 (2008).
2. A. Stirbet and Govindjee, *Photosynth. Res.* **113** (1–3), 15 (2012).
3. А. Штирбет, Г. Ю. Ризниченко, А. Б. Рубин и др., *Биохимия* **79** (4), 379 (2014).
4. G. C. Papageorgiou, M. Tsimilli-Michael, and K. Stamatakis, *Photosynth. Res.* **94** (2–3), 275 (2007).
5. W. Vredenberg and O. Prasil, *Photosynth. Res.* **117** (1–3), 321 (2013).
6. D. Lazár, *J. Plant Physiol.* **175C**, 131 (2015).
7. L. N. M. Duysens and H. E. Sweers, in *Stud. licroalgae Photosynth. bacteri* (1963), pp. 353–372.
8. S. Silvestre, S. de Sousa Araújo, M. C. Vaz Patto, et al., *J. Integr. Plant Biol.* **56** (7), 610 (2014).
9. T. G. Downing, R. R. Phelan, and S. Downing, *J. Arid Environ.* **112**, 147 (2015).
10. Y. Z. Zong, W. F. Wang, Q. W. Xue, et al., *Photosynthetica* **52** (1), 63 (2014).
11. L. Lei, L. Xiang-yi, X. Xin-wen, et al., *Plant Physiol. Biochem.* **74**, 239 (2014).
12. M. Brestic, M. Zivcak, K. Olsovska, et al., *Plant Physiol. Biochem.* **81**, 74 (2014).

13. M. Zivcak, M. Brestic, H. M. Kalaji, et al., *Photosynth. Res.* **119** (3), 339 (2014).
14. M. Darwish, F. Lopez-Lauri, M. El Maataoui, et al., *J. Photochem. Photobiol. B.* **134**, 49 (2014).
15. P. Malaspina, P. Giordani, M. Faimali, et al., *Ecol. Indic.* **43**, 126 (2014).
16. B. J. Strasser and R. J. Strasser, in *Photosynth. from Light to Biosph.* Vol. 5, ed. by P. Mathis, (1995), pp. 977–980.
17. R. J. Strasser, M. Tsimilli-Michael, and A. Srivastava, in *Chlorophyll a Fluoresc. Signat. Photosynth*, Ed. by G. C. Papageorgiou, (2004), pp. 321–362.
18. S. Boisvert, D. Joly, and R. Carpentier, *FEBS J.* **273** (20), 4770 (2006).
19. P. Pospíšil and H. Dau, *Photosynth. Res.* **65** (1), 41 (2000).
20. T. Antal and A. Rubin, *Photosynth. Res.* **96** (3), 217 (2008).
21. R. J. Strasser and A. D. Stirbet, *Math. Comp. Simulations* **56**, 451 (2001).
22. D. Lazár, *J. Theor. Biol.* **220** (4), 469 (2003).
23. X.-G. Zhu, Govindjee, N. R. Baker, et al., *Planta* **223** (1), 114 (2005).
24. N. E. Belyaeva, F.-J. Schmitt, R. Steffen, et al., *Photosynth. Res.* **98** (1–3), 105 (2008).
25. N. E. Belyaeva, F.-J. Schmitt, V. Z. Paschenko, et al., *Biosystems.* **103** (2), 188 (2011).
26. Т. Ю. Плюснина, Е. Н. Воронова, В. Н. Гольцев и др., *Компьютерные исследования и моделирование* **4** (4), 943 (2012).
27. Т. Ю. Плюснина, Г. Ю. Ризниченко и А. Б. Рубин, *Физиология растений* **60** (4), 549 (2013).
28. С. С. Хрущев, Т. Ю. Плюснина и Г. Ю. Ризниченко, в сб. *Математическая биология и биоинформатика. V Международная конф., г. Пуццино, 19–24 октября 2014 г.*, под. ред. В.Д. Лахно (2014), сс. 59–60.
29. A. Srivastava, B. Guissé, H. Greppin, et al., *Biochim. Biophys. Acta – Bioenerg.* **1320** (1), 95 (1997).
30. B. Guisse, A. Srivastava, and R. J. Strasser, *Arch. des Sci. Geneve* (1995).
31. D. Lazár and P. Pospíšil, *Eur. Biophys. J.* **28** (6), 468 (1999).
32. S. Mathur, P. Mehta, and A. Jajoo, *Physiol. Mol. Biol. Plants* **19** (2), 179 (2013).
33. T. Antal, T. Krendeleva, and A. Rubin, *Photosynth. Res.* **94** (1), 13 (2007).
34. T. Antal, A. Kolacheva, A. Maslakov, et al., *Photosynth. Res.* **114** (3), 143 (2013).

## Analysis of Chlorophyll Fluorescence Transient by Spectral Multi-exponential Approximation

T.Yu. Plyusnina, S.S. Khrushev, G.Yu. Riznichenko, and A.B. Rubin

*Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia*

The method for analysis of chlorophyll fluorescence transient using approximation of measured signal by multi-exponential series is described. Visualization of partial sums of this series allows us to find amplitudes and characteristic times of individual phases of fluorescence induction curve. This method gives more rigid criteria of phase identification instead of semi-empirical approach currently used. Applied to *Chlamidomonas reinhardtii* sulfur deprivation case, it shows efficiency in finding visually undistinguishable phases of fluorescence transient for early detection of stress.

*Key words: photosynthesis, chlorophyll fluorescence transient, analysis of fluorescence induction curve, multi-exponential approximation*