

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЛИСТЬЕВ БОБОВ, ОБРАБОТАННЫХ ФТОРИДОМ НАТРИЯ

© 2015 г. О.А. Калмацкая, В.А. Караваяев

Физический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы, 1/2

E-mail: karavaev@phys.msu.ru

Поступила в редакцию 24.06.15 г.

Установлено, что обработка листьев бобов раствором NaF в концентрации 10^{-2} М приводит к изменению флуоресцентных показателей, регистрируемых методом импульсной флуориметрии. Значения F_0 и F_m уменьшались, а отношение $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$, характеризующее максимальную фотохимическую активность фотосистемы II, оставалось неизменным. Фотохимическое тушение флуоресценции (qP) в первые минуты освещения действующим светом было больше, чем в контроле, а при последующем освещении заметно уменьшалось. Нефотохимическое тушение (qN), напротив, вначале уменьшалось, а затем увеличивалось. Фотохимическая активность (показатель $(F_M - F_T)/F_T$) после обработки листьев NaF снижалась. Полученные результаты интерпретируются исходя из ингибирующего действия NaF на фосфатазу и его влияния на перераспределение энергии возбуждения хлорофилла между фотосистемами II и I, с одной стороны, и негативного воздействия фторида на АТФазный комплекс и цикл Кальвина–Бенсона – с другой.

Ключевые слова: фторид натрия, хлорофилл, индукция флуоресценции, фото- и нефотохимическое тушение флуоресценции.

Регуляция световых стадий фотосинтеза высших растений (поглощение света, миграция энергии возбуждения по пигментной матрице, разделение зарядов в реакционных центрах, электронный транспорт между фотосистемами) играет важную роль в повышении эффективности всего фотосинтетического процесса [1,2]. Один из регуляторных механизмов, обеспечивающих согласованную работу фотосистемы I (ФС I) и фотосистемы II (ФС II), заключается в перераспределении энергии возбуждения между ними в зависимости от интенсивности и спектрального состава действующего света [3]. Это перераспределение осуществляется за счет пространственного перемещения части светособирающих комплексов (ССК) вдоль фотосинтетической мембраны, включающей комплексы ФС I и ФС II. Перераспределение энергии в пользу ФС I происходит при фосфорилировании белков ССК специальным ферментом протеинкиназой, активность которой зависит от степени восстановленности пластохинона; перераспределение в пользу ФС II происходит при

дефосфорилировании белков под действием фосфатазы [4,5].

В адаптированных к темноте хлоропластах переносчики электронов между фотосистемами находятся в окисленном состоянии и подвижные комплексы «обслуживают» комплексы ФС II (состояние 1). При включении света, эффективно поглощаемого в ФС II, переносчики восстанавливаются и происходит переход в состояние 2, когда подвижные комплексы «обслуживают» ФС I. Предполагается, что подобный переход является одной из причин тушения флуоресценции хлорофилла *a* (Хл *a*) при освещении фотосинтезирующих объектов после их выдерживания в темноте [6,7].

Фторид натрия является специфическим ингибитором фосфатазы [8] и, таким образом, может оказывать влияние на эффективность взаимодействия ФС I и ФС II. Большая часть работ по изучению влияния NaF на световые стадии фотосинтеза выполнена с использованием флуоресцентных методов. Было, в частности, показано, что фосфорилирование белков ССК «насыщается» при относительно низкой интенсивности действующего света и снижается на относительно сильном свете [8]. Авторы [9] в опытах на листьях шпината, обработанных раствором NaF в концентрации 2 мМ, не об-

Сокращения: ФС I – фотосистема I, ФС II – фотосистема II, ССК – светособирающий комплекс, Хл *a* – хлорофилл *a*.

наружили существенных изменений фотохимической активности ФС II, однако скорость выделения O_2 на насыщающем свете при этом существенно уменьшалась.

Интерес исследователей к флуоресцентным показателям растений, обработанных NaF, связан не только с его ингибирующим действием на фосфатазу и возможностью изучения регуляторных механизмов фотосинтеза. Фтор и его соединения являются загрязнителями окружающей среды и в больших концентрациях оказывают токсическое действие на растения [10–14]. Показано, что NaF негативно влияет на прорастание семян, приводит к уменьшению биометрических показателей, снижению содержания хлорофилла и ухудшению устьичной проводимости [10,11,14]. Соли фтора оказывают ингибирующее действие на фотосинтетическую активность, гликолиз и синтез сахарозы [12]. Установлено, что добавление NaF к хлоропластам бобов приводит к нарушениям в работе ряда ферментов цикла Кальвина–Бенсона, снижает активность АТФазы и скорость сопряженного с синтезом АТФ нециклического электронного транспорта [13]. Анализ имеющихся в литературе данных показывает, что влияние солей фтора на фотосинтезирующие объекты зависит от ряда факторов: концентрации, способа и продолжительности обработки, вида и даже сорта растений [9–12].

Флуоресцентные методы широко используются при изучении структурно-функциональной организации фотосинтетического аппарата растений в различных условиях [15–18]. В предыдущих работах [19–23] с использованием метода медленной индукции флуоресценции изучены изменения функциональной активности листьев растений под действием ряда физиологически активных веществ: растительных экстрактов, регуляторов роста, ингибиторов и активаторов фотосинтеза. В работе [24] были исследованы кривые медленной индукции флуоресценции листьев бобов непосредственно после введения в жилку растворов NaF и установлены закономерные изменения в форме кривых, которые интерпретированы с учетом влияния фторида на перераспределение энергии возбуждения между фотосистемами. Цель данной работы – исследовать флуоресцентные показатели листьев бобов после более длительного (трехчасового) воздействия NaF на лист растения с тем, чтобы установить различные аспекты его влияния на фотосинтетическую активность. В работе использована методика импульсной флуориметрии, позволяющая получить более детальную информацию о функционировании световых процессов фотосинтеза по сравнению с обыч-

ной, однолучевой схемой регистрации флуоресценции [25].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проростки бобов *Vicia faba* L. (сорт «Русские черные») выращивали в пакетах с почвой объемом 0,5 л в лабораторных условиях с дополнительным освещением лампой ESB143-65 W, продолжительность светового дня составляла около 9 ч. В эксперименте использовали листья третьего яруса четырехнедельных проростков. Растворы фторида и хлорида натрия в концентрации $2 \cdot 10^{-2}$ М вводили в лист, не отрывая его от стебля, через центральную жилку с помощью медицинского шприца. Затем растение выдерживали 3 ч в затененном месте для естественного выведения излишка влаги из тканей листа.

Измерение кинетики флуоресценции Хл *a* листа и светотоиндуцированных изменений флуоресцентных параметров проводили на импульсном флуориметре РАМ-2500 (Walz, Германия). Растение помещали в темную камеру, лист фиксировали в держателе флуориметра и выдерживали в течение 5 мин в полной темноте для стандартизации условий эксперимента. Протоколы измерения флуоресценции листа представлены на рис. 1. Флуоресценция возбуждается импульсным измерительным светом ($\lambda = 630$ нм, $\Delta\lambda = 5$ нм, $I = 10$ мкмолей фотонов/(m^2c), сразу после включения измерительного света определяется исходный уровень флуоресценции F_0 . Максимальный уровень флуоресценции F_m определяется при освещении листа насыщающей вспышкой света ($\lambda = 630$ нм, $\tau = 0,5$ мс, $I = 3400$ мкмолей фотонов/(m^2c)). Далее лист освещается действующим светом ($\lambda = 455$ нм, $I = 150$ мкмолей фотонов/(m^2c), при этом каждые 20 с подаются насыщающие вспышки света. Через 20 мин освещения действующий свет выключается и происходит темновая релаксация, при которой образец находится под воздействием периодически подаваемых насыщающих вспышек. Вычисление коэффициентов фото- и нефотохимического тушения (qP и qN соответственно) производится по формулам: $qP = (F'_m - F)/(F'_m - F'_0)$, $qN = 1 - (F'_m - F'_0)/(F_m - F_0)$, где F'_0 – автоматически рассчитываемый, текущий уровень флуоресценции от измерительного света [25]. Характерные времена различных компонент нефотохимического тушения флуоресценции определяли по соответствующим кривым релаксации, полученным при освещении вспышками света высокой интенсивности после выключения действующего

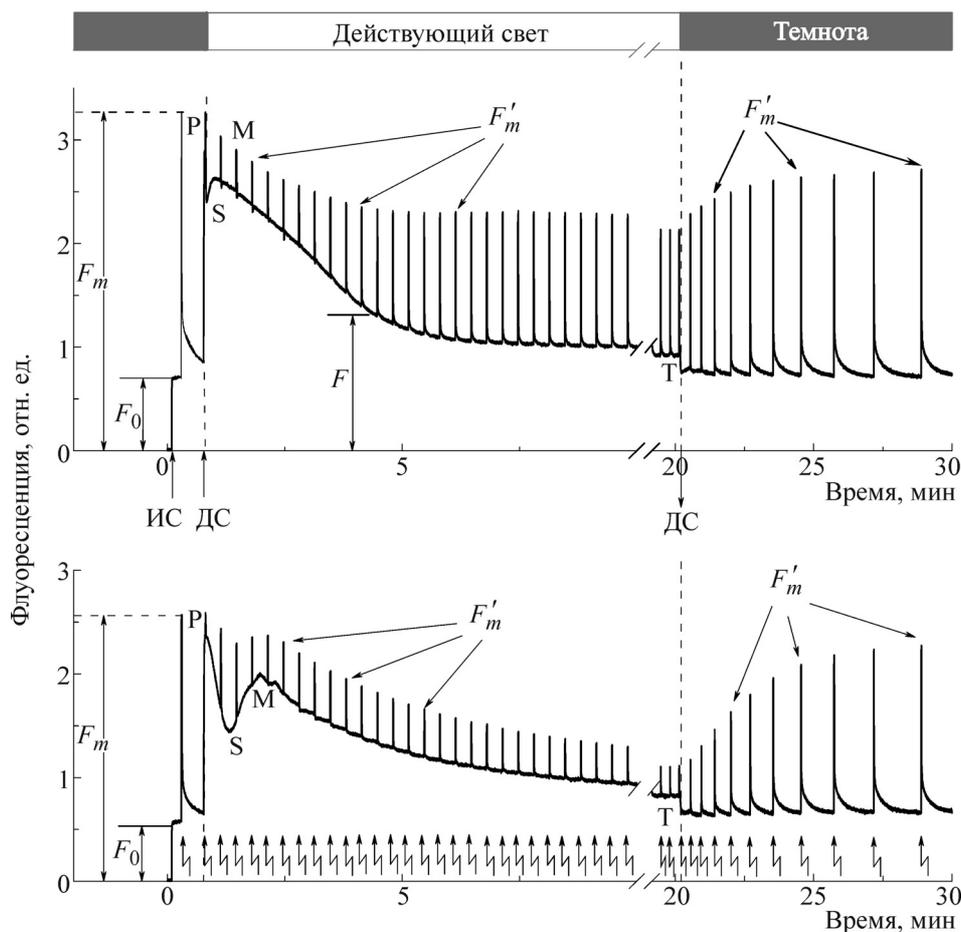


Рис. 1. Характерные изменения интенсивности флуоресценции хлорофилла *a* листьев бобов, обработанных растворами NaCl (вверху) и NaF (внизу). ИС – измерительный свет; ДС – действующий свет. Моменты включения измерительного света, включения и выключения действующего света показаны вертикальными стрелками, моменты вспышек света насыщающей интенсивности – зигзагообразными стрелками.

света. Основные закономерности, полученные в работе, воспроизводились в трех сериях измерений, проведенных на растениях разных посадок. В таблице приведены средние значения, полученные в опытах на четырех разных ли-

стьях одной посадки, и соответствующие среднеквадратичные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что индукционные изменения флуоресценции листьев бобов, обработанных NaF, имеют ряд особенностей по сравнению с контрольными образцами (рис. 1). Во-первых, общая интенсивность флуоресценции в случае инфильтрации NaF (значения F_0 , F_m , стационарный уровень T) была на 10–15% ниже, чем в контроле (таблица). Вероятно, это связано с тем, что выдерживание растений, обработанных ингибитором фосфатазы, на неярком свете при освещенности около 100 лк (от момента обработки листьев до измерений) приводило к увеличению доли ССК, ассоциированных с ФС I, в результате чего эффективный размер антенны ФС II становился меньше. Вместе с тем NaF не оказывал влияния на отношение $F_v/F_m =$

Флуоресцентные показатели листьев бобов, обработанных растворами NaCl и NaF

Показатель	NaCl	NaF
F_0	$0,68 \pm 0,02$	$0,60 \pm 0,02$
F_m	$3,12 \pm 0,06$	$2,78 \pm 0,04$
$(F_m - F_0)/F_m$	$0,77 \pm 0,01$	$0,78 \pm 0,01$
F_T	$1,00 \pm 0,05$	$0,88 \pm 0,03$
$(qP)_{\text{стац}}$	$0,78 \pm 0,04$	$0,55 \pm 0,06$
$(qN)_{\text{стац}}$	$0,45 \pm 0,02$	$0,66 \pm 0,06$
$(F_M - F_T)/F_M$	$1,48 \pm 0,06$	$1,23 \pm 0,05$

Обозначения в тексте и на рис. 1.

$(F_m - F_0)/F_m$, характеризующее максимальную фотохимическую активность ФС II [25,26] (таблица). Это свидетельствует о том, что обработка листьев NaF не приводила к повреждению реакционных центров ФС II. Уменьшение стационарного уровня T наблюдалось ранее при регистрации медленной индукции флуоресценции сразу после введения раствора NaF в жилку листа [24]. Авторы [9], однако, не наблюдали существенных изменений значений F_0 и F_m , что, очевидно, связано с использованием меньшей концентрации NaF и иным способом обработки листа шпината.

Во-вторых, имеются отличия на начальном участке кривых индукции (стадия P-S-M, рис. 1). При обработке листьев NaF наблюдалось более сильное тушение флуоресценции Хл a на стадии P-S и замедление переходной кинетики P-S-M по сравнению с контролем. Для объяснения этих изменений следует обратиться к имеющейся в литературе интерпретации кривой медленной индукции флуоресценции. Предполагается [7,14,27], что рост флуоресценции до максимального значения P при включении действующего света связан с восстановлением первичных акцепторов электронов ФС II, а последующий спад (стадия P-S) – с началом образования ΔpH на мембране тилакоидов и активацией ферментов на акцепторной стороне ФС I. Наиболее быстро на свету активируется терминальный фермент электрон-транспортной цепи – Фд-НАДФ⁺-редуктаза: уже через несколько секунд освещения ускорение оттока электронов от ФС I способствует ускорению электронного транспорта между ФС II и ФС I и, соответственно, реокислению Q^- , при этом флуоресценция Хл a уменьшается. На стадии S-M происходит замедление электронного транспорта между ФС II и ФС I за счет генерации ΔpH . Тушение флуоресценции на стадии M-T обычно подразделяют на фотохимическое (коэффициент qP), связанное с активацией цикла Кальвина-Бенсона и снижением степени восстановленности переносчиков электронов между фотосистемами, и нефотохимическое (коэффициент qN), обусловленное увеличением ΔpH и перераспределением энергии возбуждения в пользу ФС I при фосфорилировании белков ССК. Еще один, обсуждаемый в последнее время, механизм тушения флуоресценции Хл a связан с так называемым явлением «разбегания» хлоропластов («avoidance effect») при освещении фотосинтезирующих объектов достаточно сильным возбуждающим флуоресценцию светом [28,29].

В конструкции импульсного флуориметра разделены фото- и нефотохимическое тушения

осуществляется за счет вспышек света высокой интенсивности (рис. 1); коэффициенты qP и qN рассчитываются по формулам, приведенным в разделе «Материалы и методы». Исходя из приведенной выше интерпретации медленной индукции флуоресценции, усиленное тушение P-S и замедление переходной кинетики P-S-M в присутствии NaF можно объяснить уменьшением антенны ФС II при ингибировании фосфатазы, в результате чего восстановление переносчиков электронов между фотосистемами и образование ΔpH на мембране тилакоидов замедляются. Этот вывод подтверждается изменениями в кинетике фотоиндуцированных изменений qP и qN (рис. 2): в первые две минуты освещения действующим светом значения qP оказываются выше, а qN – ниже, чем в контроле.

Вместе с тем стационарные значения коэффициента qP для листьев, обработанных NaF, были заметно ниже, чем в контроле (степень восстановленности переносчиков электронов между фотосистемами выше), а стационарные значения qN – выше (значения ΔpH – выше, чем в контроле) (рис. 2, таблица). Эти изменения могут быть следствием известного из литературы ингибирующего действия NaF на работу АТФазного комплекса и основной фермент цикла Кальвина-Бенсона РБФ-карбоксилазу-оксигеназу (Рубиско) [13]. В результате отток восстановленных фотопродуктов от ФС I и скорость фотофосфорилирования уменьшаются, а степень восстановленности переносчиков между фотосистемами и значения ΔpH увеличиваются.

Отметим, что отношение $Rfd = (F_M - F_T)/F_T$ (F_M и F_T – значения флуоресценции, соответствующие второму пику M и стационарному уровню T , рис. 1) при обработке листьев NaF было существенно ниже, чем в контроле (таблица), что совпадает с данными, полученными в работах [9,24]. Ранее было показано, что относительные изменения этого показателя соответствуют относительным изменениям фотосинтетической активности, оцениваемой по скорости ассимиляции CO_2 в расчете на хлорофилл [23,29]. Таким образом, можно заключить, что обработка листьев NaF приводила к снижению их фотосинтетической активности, что соответствует изменениям стационарных значений коэффициентов qP и qN , отмеченным выше.

В ходе эксперимента были также определены величины и характерные времена темновой релаксации различных компонент нефотохимического тушения флуоресценции. В контроле наблюдались две компоненты релаксации тушения: быстрая (около 1 мин), которую следует сопоставить со снятием так называемого энер-

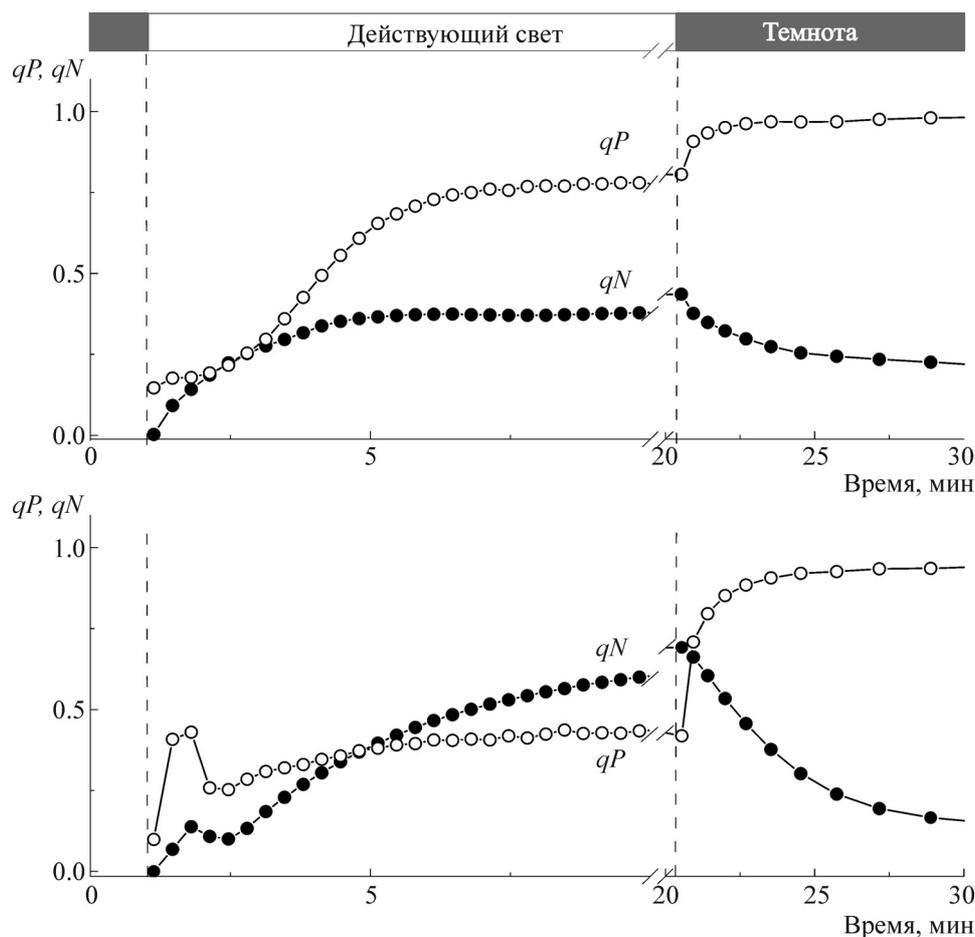


Рис. 2. Характерные изменения коэффициентов фотохимического и нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* листьев бобов, обработанных растворами NaCl (вверху) и NaF (внизу).

гетического тушения (диссипация ΔpH), и медленная (более 10 мин), которая может быть обусловлена несколькими факторами, в частности миграцией подвижных ССК и увеличением антенны ФС II при дефосфорилировании белков ССК под действием фосфатазы [6,8]. Существенно, что в случае NaF, ингибирующего фосфатазу, наблюдалась лишь одна компонента релаксации qN с характерным временем около 3 мин, связанная, очевидно, с замедленной диссипацией ΔpH .

Действие фторида натрия на общее физиологическое состояние листьев бобов проявлялось в их постепенном увядании в течение нескольких дней после обработки NaF. При обработке листьев NaCl видимых изменений в их состоянии не наблюдалось.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наблюдавшиеся в данной работе изменения флуоресцентных показателей листьев бобов, об-

работанных раствором фторида натрия, можно объяснить исходя из: 1) его ингибирующего действия на фосфатазу и влияния на перераспределение энергии возбуждения хлорофилла между ФС II и ФС I и 2) негативного воздействия фторида на АТФазный комплекс и цикл Кальвина–Бенсона, в результате чего снижается скорость фотофосфорилирования и отток восстановленных фотопродуктов от ФС I.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. Б. Рубин и Т. Е. Кренделева, Успехи биол. химии **43**, 225 (2003).
2. A. N. Tikhonov, Photosynth. Res. **116**, 511 (2013).
3. D. J. Kyle, L. A. Staehelin, and C. J. Arntzen, Arch. Biochim. Biophys. **222**, 527 (1983).
4. J. Minagava, Biochim. Biophys. Acta **1807**, 897 (2011).
5. M. Tikkanen and E.-M. Aro, Biochim. Biophys. Acta **1817**, 232 (2012).
6. W. P. Quick and M. Stitt, Biochim. Biophys. Acta **977**, 287 (1989).
7. D. Lazar, Biochim. Biophys. Acta **1412**, 1 (1999).

8. P. Horton and A. Hague, *Biochim. Biophys. Acta* **932**, 107 (1988).
9. S. R. Boese, D. C. MacLean, and D. El-Mogazi, *Environmental Pollution* **89**, 203 (1995).
10. S. Gupta, S. Banerjee, and S. Mondal, *Fluoride* **42**, 142 (2009).
11. M. Baunthiyal and V. Sharma, *Int. J. Phytoremediation* **16**, 397 (2014).
12. P. Quick, E. Neuhaus, R. Feil, and M. Stitt, *Biochim. Biophys. Acta* **973**, 263 (1989).
13. J. Giannini, G. W. Miller, and J. C. Pushnik, *Fluoride* **18**, 72 (1985).
14. M. Singh and K. K. Verma, *Fluoride* **46**, 83 (2013).
15. G. H. Krause and E. Weis, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 313 (1991).
16. *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, Ed. by G. C. Papageorgiou, Govindjee (Springer, Dordrecht, 2004).
17. Т. В. Несеренко, А. А. Тихомиров и В. Н. Шихов, *Журн. общей биологии* **68**, 444 (2007).
18. O. P. Samoiloova, V. V. Ptushenko, I. V. Kuvykin, et al., *BioSystems* **105**, 41 (2011).
19. В. А. Караваев, Л. Э. Гунар, А. Г. Мякинников и др., *Биофизика* **57**, 662 (2012).
20. С. А. Глазунова, В. В. Птушенко, Л. Э. Гунар и др., *Биофизика* **54**, 492 (2009).
21. О. А. Калмацкая, В. А. Караваев, Л. Э. Гунар и А. Г. Мякинников, *Биофизика* **60**, 169 (2015).
22. V. A. Karavaev, M. K. Solntsev, T. P. Yurina, et al., *Biol. Bull.* **28**, (2001).
23. V. A. Karavaev, I. B. Polyakova, M. K. Solntsev, and T. P. Yurina, *J. Luminescence* **76&77**, 335 (1998).
24. В. А. Караваев, Т. Л. Шагурина и А. К. Кукушкин, *Физиология растений* **34**, 221 (1987).
25. K. Maxwell and G. N. Johnson, *J. Exp. Botany* **51**, 659 (2000).
26. B. Demmig-Adams, C. M. Cohu, O. Muller, and W. W. Adams III, *Photosynth. Res.* **113**, 75 (2012).
27. Н. В. Карапетян и Н. Г. Бухов, *Физиология растений* **33**, 1013 (1986).
28. P. A. Davis, S. Caylor, C. W. Whippo, and R. P. Hangarter, *Plant, Cell and Environment* **34**, 2047 (2011).
29. S.-G. Kong and M. Wada, *Biochim. Biophys. Acta* **1837**, 522 (2014).
30. В. А. Караваев, И. О. Белогрудов и А. К. Кукушкин, *Биофизика* **34**, 710 (1989).

Fluorescent Indices of Bean Leaves Treated with Sodium Fluoride

O.A. Kalmatskaya and V.A. Karavaev

Department of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia

It is shown that the treatment of bean leaves with NaF in concentration of 10^{-2} M resulted in the alteration of fluorescent indices registered by the method of pulse fluorimetry. Fluorescent parameters F_0 and F_m decreased, but the ratio $F_v/F_m=(F_m - F_0)/F_m$, characterizing the maximal photochemical activity of photosystem II remained invariable. Photochemical fluorescence quenching (qP) was higher than in control during the first minutes of illumination with the actinic light, and it markedly decreased with the following illumination. Nonphotochemical quenching (qN), in contrary, decreased at the beginning of illumination, and then increased. Photosynthetic activity as characterizing by the ratio $(F_M - F_T)/F_T$ reduced after the leaf treatment with NaF. Results obtained are interpreted proceeding, on the one hand, from the influence of NaF on redistribution of excitation energy between photosystem II and photosystem I and its inhibitory effect on the ATPase complex and Kalvin-Benson cycle, on the other.

Key words: sodium fluoride, chlorophyll, fluorescence induction, photochemical and nonphotochemical fluorescence quenching