

ДИСТАНЦИОННОЕ ЗОНДИРОВАНИЕ АТМОСФЕРЫ, ГИДРОСФЕРЫ
И ПОДСТИЛАЮЩЕЙ ПОВЕРХНОСТИ

УДК 577.3

Е.Н. Заворуева, В.В. Заворуев*

**Концентрационные зависимости отношения красной
и дальней красной флуоресценции хлорофилла
высших растений**

Красноярская архитектурно-строительная академия

**Институт вычислительного моделирования СО РАН, г. Красноярск*

Поступила в редакцию 20.08.2002 г.

Изучена зависимость параметра F_{682}/F_{734} — отношения интенсивностей излучения в красной и дальней красной области от концентрации хлорофиллов в условиях непрерывного освещения растений в процессе выращивания и естественного фотопериода. Показано, что зависимость параметра F_{682}/F_{734} от содержания хлорофиллов для растений, выращенных на непрерывном свете, описывается квадратичным уравнением, а для растений, выращенных в естественных условиях, — степенной функцией. Третий тип концентрационной зависимости параметра F_{682}/F_{734} получен на листьях тополя в процессе их вегетации. Зависимость имеет сложный характер и не описывается степенной и квадратичной функциями. Делается вывод, что все выясненные к настоящему времени зависимости применимы к конкретным условиям выращивания и нет универсальной функции, связывающей отношение красной и дальней красной флуоресценции с содержанием пигментов в листьях высших растений. Представленные в работе результаты хорошо объясняются моделью, по которой каждая фотосистема излучает на определенной длине волны.

Введение

Флуоресценция хлорофилла α зеленого листа характеризуется двумя максимумами в красной области спектра [1–3]. Существуют две точки зрения на механизм возникновения флуоресценции в диапазонах 680–685 нм (F_{682}) и 730–740 нм (F_{734}). В одном случае считается, что спектр с двумя пиками флуоресценции формируется явлением реабсорбции излучения и стоковым сдвигом. В этой модели источником флуоресценции является фотосистема II (ФС II) — полоса флуоресценции 680–685 нм. Излучение с $\lambda = 680–685$ нм поглощается фотосистемой I (реабсорбция), и поглощенная энергия переизлучается на 730 нм [2, 4]. В соответствии с другой точкой зрения флуоресценция на 685 нм обусловлена хлорофиллом ФС II, а на длине волны 730 нм — хлорофиллом ФС I [3, 5, 6].

Установлено, что величина отношения интенсивностей излучения в красной и дальней красной области зависит от содержания пигментов [2–5]. При этом во всех работах по изучению изменения концентрационных зависимостей параметра F_{682}/F_{734} исследования были выполнены на листьях растений, выращенных в условиях естественного фотопериода, и пробы для анализа флуоресцентных параметров отбирались одновременно. Полученный ход кривой параметра F_{682}/F_{734} от концентрации пигментов объяснялся реабсорбцией излучения хлорофилла α [2, 4]. При этом считалось, что доля флуоресценции, излучаемой хлорофиллом ФС I на 734 нм, незначительна и ее вкладом можно пренебречь [2, 4].

Однако в литературе накапливаются факты, находящиеся в противоречии с представлением о реабсорбционном излучении хлорофилла в листьях растений [7, 8] и доли флуоресценции ФС I в общем флуоресцентном сигнале [9]. По последним данным вклад ФС I во флуоресценцию на 734 нм может достигать 35% [9]. Кроме этого, показано, что отношение красной и дальней красной флуоресценции зависит от интенсивности и продолжительности освещения при выращивании растений [10, 11]. В связи с вышеизложенным целью данной работы было изучение зависимости параметра F_{682}/F_{734} от суммы концентрации хлорофиллов в различных световых условиях выращивания растений для получения доказательств в пользу той или иной модели формирования флуоресцентных пиков.

Методы исследования

Объектом исследования служили листья огурца (*Cucumis sativum L.*) сорта «Московский тепличный» и листья тополя бальзамического (*Populus balsamifera*). Растения огурца выращивали двумя способами: на открытом грунте вблизи г. Красноярск (56°00' с.ш., 92°45' в.д.) в период с июля до конца августа и в вегетационных шкафах в контролируемых условиях методом гидропонии на керамзите при непрерывном облучении (интенсивность 120 Вт/м² ФАР). В качестве источника излучения использовали лампу ДКСТВ-6000, спектр которой близок к солнечному. Листья тополя были собраны в мае–октябре 2001 г. на территории Академгородка

г. Красноярска. Сформированные листья отбирали с 10 деревьев в 12 ч дня местного времени с интервалом 3–4 нед. Изучение зависимости F_{682}/F_{734} от суммы концентрации хлорофиллов проводили в трех световых условиях: непрерывного освещения в процессе выращивания, при фиксированном режиме свет–темнота (в этом случае для анализа флуоресцентных параметров листьев разных ярусов растений, отличающихся световой окраской, отбирали одновременно), при переменном режиме свет–темнота в процессе вегетации, когда изменение светового периода определяется астрономическим ходом Солнца.

Измерение параметров интенсивности флуоресценции хлорофилла листьев растений проводили на флуориметре, описание которого и методика измерения даны в работе [12]. Интенсивность возбуждающего света составляла 180 Вт/м^2 ФАР.

Перед регистрацией флуоресценции высечки листьев выдерживали в темноте в чашке Петри с влажной фильтровальной бумагой в течение 10–15 мин [2]. Люминесценцию регистрировали при комнатной температуре.

Оценку состояния фотосинтетического аппарата листьев растений проводили по «stress adaptation index», который определяли по формуле, приведенной в работе [13]:

$$A_p = 1 - \frac{1 + R_f(734)}{1 + R_f(682)}, \quad R_f = (F_m - F_s)/F_s,$$

где F_m и F_s – максимальный и стационарный уровни флуоресценции [2]; в скобках – длина волны флуоресценции. Фотосинтетические пигменты из листьев экстрагировали 96%-м этанолом, концентрации пигментов определяли спектрофотометрически, используя коэффициенты экстинкции [14]. Содержание пигментов, приходящихся на единицу поверхности листа, выражали в мг/дм^2 и для построения зависимости F_{682}/F_{734} от концентрации суммы хлорофиллов α и β нормировали на 1 мг/дм^2 . Результаты измерений флуоресцентных параметров и концентрации пигментов были статистически обработаны.

Результаты

Зависимость величины параметра F_{682}/F_{734} от концентрации суммы хлорофиллов α и β для растений огурца, выращенных на непрерывном свете, показана на рис. 1. Она хорошо описывается квадратичным уравнением

$$F_{682}/F_{734} = 0,064x^2 - 0,708x + 2,252; \quad R^2 = 0,96, \quad (1)$$

где x – численные значения суммарной концентраций хлорофиллов a и b , выраженной в мг/дм^2 ; R^2 – коэффициент корреляции.

Распределение суммарного содержания хлорофиллов в листьях разных ярусов в этих условиях характеризовалось следующим образом. Для первого и второго ярусов концентрации составляли от 4,5 до 6 мг/дм^2 , третьего и четвертого – от 6 до 7 мг/дм^2 , пятого и шестого – от 3,5 до 4,5 мг/дм^2 .

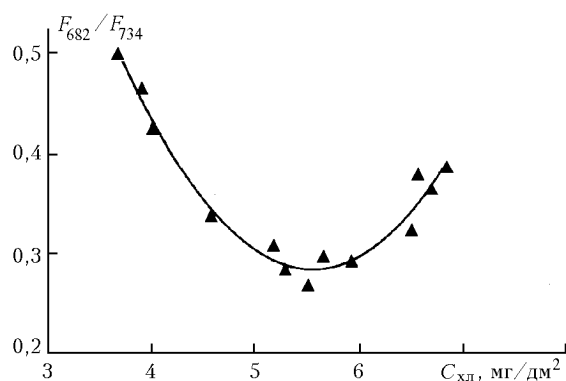


Рис. 1. Зависимость параметра F_{682}/F_{734} от концентрации суммы хлорофиллов $C_{хл}$ при выращивании растений огурца на непрерывном свете

Для растений, выращенных на открытом грунте в естественных условиях, т.е. при фиксированном режиме свет–темнота, наблюдается обратно пропорциональная зависимость параметра F_{682}/F_{734} от содержания пигментов (рис. 2). Ход кривой может быть описан уравнением

$$F_{682}/F_{734} = 0,91x^{-0,46}; \quad R^2 = 0,92. \quad (2)$$

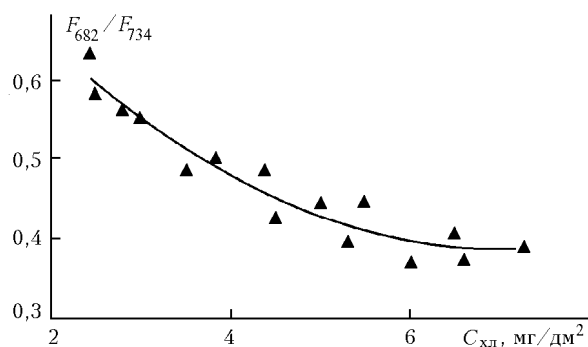


Рис. 2. Зависимость параметра F_{682}/F_{734} от концентрации суммы хлорофиллов $C_{хл}$ при выращивании растений огурца на открытом грунте при естественном освещении

Из представленных на рис. 1 и 2 кривых видно, что при одинаковых концентрациях хлорофиллов в диапазоне от 4 до 7 мг/дм^2 значения параметра F_{682}/F_{734} меньше на постоянном свете. Изучение закономерности изменения флуоресценции F_{682} и F_{734} от содержания хлорофиллов в листьях растений в условиях разных фотопериодов показало следующее: для прерывистого освещения F_{682} можно описать функцией

$$F_{682} = 62,69e^{-0,672x}; \quad R^2 = 0,90, \quad (3)$$

а для постоянного света

$$F_{682} = 120,43e^{-0,665x} + 7,12; \quad R^2 = 0,89. \quad (4)$$

Из уравнений (3) и (4) следует, что концентрационное изменение интенсивности флуоресценции на 682 нм практически не зависит от режима освещения (прерывистого или постоянного).

При естественном фотопериоде изменение интенсивности флуоресценции на 734 нм от содержания хлорофиллов аппроксимируется уравнением

$$F_{734} = 0,28x^2 - 3,86x + 44,30; \quad R^2 = 0,92, \quad (5)$$

а при непрерывном освещении

$$F_{734} = -1,33x^2 + 8,72x + 25,68; \quad R^2 = 0,93. \quad (6)$$

Видно, что лучи парабол функций (5) и (6) разнонаправлены.

Следовательно, ход кривых, описываемых уравнениями (1) и (2), определяется главным образом закономерностью изменения интенсивности флуоресценции на 734 нм.

Концентрационная и временная зависимости параметра F_{682}/F_{734} при переменном режиме свет-темнота в процессе вегетации были изучены на листьях тополей. Изменение отношения F_{682}/F_{734} в процессе вегетации листьев показано на рис. 3. Отношение F_{682}/F_{734} практически не претерпевало резких изменений вплоть до сентября и только в октябре увеличилось в 2 раза. Этот период времени характеризовался заморозками в ночные часы, изменением окраски листьев с зеленой на желтую.

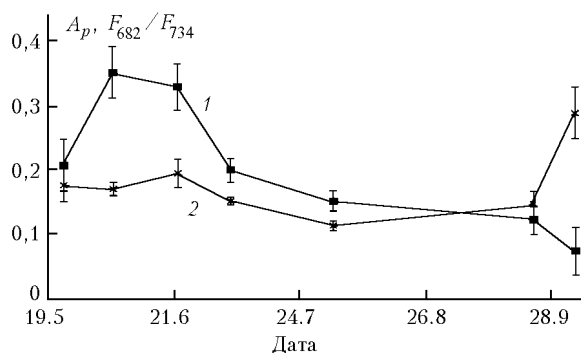


Рис. 3. Изменение «stress adaptation index» (1) и отношения F_{682}/F_{734} (2) в процессе вегетации листьев тополей

О состоянии фотосинтетического аппарата листьев деревьев судили по «stress adaptation index». Из рис. 3 видно, что наибольшие значения индекса A_p наблюдали в июне, когда листья были зелеными и без патологических изменений. В последующие месяцы индекс постоянно уменьшался. В это же время на листьях деревьев появились морфологические изменения и паразитирующие организмы *Phyllonorycter populifoliella* и *Pemphigus bursarius*. Перед переходом деревьев в состояние покоя A_p достигал минимального значения, а для некоторых тополей он был равен нулю. Это свидетельствовало о необратимых изменениях в процессе фотосинтеза листьев деревьев [13]. При вегетации деревьев изменения A_p и отношения F_{682}/F_{734} были различны и не имели корреляционных связей.

Зависимость величины F_{682}/F_{734} от концентрации хлорофиллов в листьях в процессе вегетации тополей показана на рис. 4. Она имеет сложный характер.

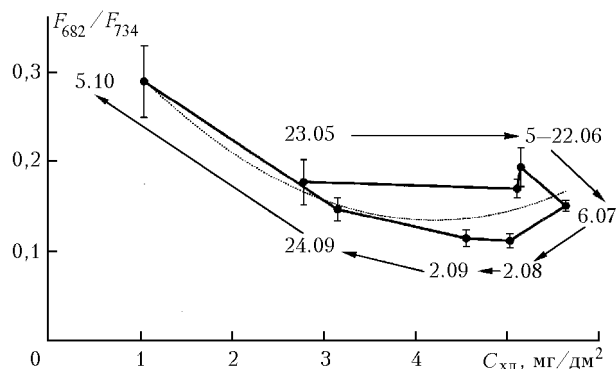


Рис. 4. Зависимость отношения F_{682}/F_{734} от концентрации хлорофиллов $C_{хл}$ листьев тополей в процессе вегетации (сплошная линия) и ее аппроксимация квадратичной функцией (пунктирная линия). Цифры указывают даты отбора проб, а стрелки — временную последовательность

Аппроксимация данных, приведенных на рис. 4, функциями, выявленными в работах [2, 3, 5], дала следующие коэффициенты корреляции:

$$y = 0,27x^{-0,39}; \quad R^2 = 0,53;$$

$$y = 0,0156x^2 - 0,13x + 0,41; \quad R^2 = 0,79.$$

Квадратичное уравнение математически достаточно хорошо описывает распределение отношения F_{682}/F_{734} от содержания хлорофиллов, однако парабола проходит через доверительный интервал только в трех точках из восьми. Следовательно, представленная на рис. 4 концентрационная зависимость отличается от ранее известных функций: степенной и квадратичной.

Обсуждение результатов

Полученные результаты по выращиванию растений огурца свидетельствуют о том, что режим освещения (непрерывный или прерывистый) изменяет вид концентрационной зависимости интенсивности флуоресценции F_{734} , что не наблюдается с флуоресценцией F_{682} [уравнения (3)–(6)]. Вследствие этого у растений огурца, выращенных на постоянном свете высокой интенсивности, изменение параметра F_{682}/F_{734} в зависимости от концентрации хлорофиллов описывается параболической функцией [уравнение (1)], а на непрерывном — степенной [уравнение (2)].

Для растений, выращенных на непрерывном свете, величина параметра F_{682}/F_{734} была минимальна в нижних листьях и возрастала в средних (зрелых) и в верхних (молодых) листьях. Для растений при естественном световом режиме выращивания этот параметр был минимальным в зрелых листьях среднего яруса в отличие от молодых и старых листьев. Этот факт полностью совпадает с выводами, полученными для широколиственных деревьев [15]. Отсюда следует, что величина параметра F_{682}/F_{734} не имеет однозначной связи ни с возрастом, ни с концентрацией хлорофиллов (см. рис. 1). Явлением реабсорбции нельзя объяснить ход кривой.

Возможно, эффект реабсорбции имеет место при определенных условиях, однако в случае выращивания на непрерывном свете в растениях происходят структурно-функциональные изменения, которые способны оказывать более существенное влияние на форму спектра флуоресценции хлорофилла α в листьях, чем реабсорбция.

Представленная на рис. 4 функция зависит от двух параметров: содержания хлорофилла и времени вегетации. Новый вид зависимости отношения F_{682}/F_{734} от концентрации хлорофиллов объясняется, во-первых, методикой сбора листьев для измерений. В наших исследованиях пробы отбирали в процессе вегетации растений, а в работах [2, 4] листья с различной цветовой окраской брали одновременно. Во-вторых, в процессе вегетации листьев тополя долгота дня и, следовательно, длительность облучения растений солнечным светом для каждой серии измерений были различные (от 11 до почти 18 ч), а в выполненных ранее исследованиях — одинаковые.

Известно, что продолжительность и интенсивность освещения влияют на структурную организацию хлоропластов и, как следствие, на величину длинноволновой флуоресценции [10]. Поэтому практически при одной и той же концентрации хлорофилла ($5,03\text{--}5,15\text{ мг/дм}^2$), но разной продолжительности дня отношения интенсивностей флуоресценции F_{682}/F_{734} составляло: 5 июня $0,17 \pm 0,01$; 22 июня — $0,19 \pm 0,02$; 2 августа — $0,11 \pm 0,01$ (см. рис. 3). Поскольку при почти равном содержании пигментов в листьях эффект реабсорбции одинаков, то уменьшение отношения F_{682}/F_{734} в августе может быть связано либо с физиологическими процессами, либо со структурными изменениями в фотосинтетическом аппарате.

Известным стрессовым фактором, влияющим на величину F_{682}/F_{734} , является водный дефицит растений. Однако на сорванных и высушенных на воздухе в течение 36 ч листьях соотношение пиков сигналов красной флуоресценции хлорофиллов изменяется не более чем на 25% [1]. В листьях тополя величина отношения интенсивностей F_{682}/F_{734} уменьшилась почти в два раза в августе по сравнению с аналогичным параметром в июне.

Таким образом, зависимость параметра F_{682}/F_{734} от концентрации хлорофиллов, изменяющихся в процессе вегетации, вероятно, отражает соотношение ФС II/ФС I в фотосинтетическом аппарате листьев в определенные моменты развития деревьев. Если принять во внимание, что флуоресценция на длине волны 734 нм является индикатором ФС I, а 682 нм — ФС II, то увеличение отношения F_{682}/F_{734} в октябре, вероятно, связано со значительным количественным преобладанием ФС II относительно ФС I в фотосинтетическом аппарате листьев перед их гибелью. Этот вывод подтверждается данными работ Сенокее, в которых показана более высокая чувствительность к замораживанию ФС I по сравнению с ФС II [7, 8]. При изучении фотосинтетического аппарата листьев высших растений, выращенных в различных световых условиях, необходимо исследовать как отношения F_{682}/F_{734} , так и

A_p , поскольку первый характеризует изменения, происходящие во второй и первой фотосистемах, а второй — указывает на повреждения в фотосинтетическом аппарате в целом. Если значения A_p высоки, то это свидетельствует об обратимых повреждениях в хлоропластах растений.

Заключение

В данной статье рассмотрены три типа концентрационного изменения отношения красной и дальней красной флуоресценции. Все выявленные к настоящему времени зависимости отношения F_{682}/F_{734} от концентрации хлорофилла применимы к конкретным условиям выращивания растений и методике отбора проб для измерения, и нет универсальной функции, связывающей отношение красной и дальней красной флуоресценции с содержанием пигментов в листьях высших растений, как об этом утверждается в работах [2, 4]. Представленные в работе результаты хорошо объясняются моделью, по которой каждая фотосистема излучает на определенной длине волны. Один из основных аргументов противников этой теории основывается на факте отсутствия флуоресценции при комнатной температуре у изолированной фотосистемы I. Однако в этом случае они забывают об эмерджентности. Фотосинтетическая система может приобретать новые свойства, черты, качества, не присущие ни одному из объединенных в ней объектов. В этом плане представляются перспективными исследования концентрации зависимости красной и дальней красной флуоресценции при импульсном лазерном возбуждении люминесценции растений [16, 17].

Работа выполнена при финансовой поддержке Красноярского фонда науки, грант № 11 F 194 С.

1. Четвериков А.Г. Принципы исследования реальных спектров флуоресценции фотосинтезирующих объектов // Биофизика. 1989. Т. 24. С. 82–90.
2. Lichtenthaler H.K., Rinderle U. The Role of Chlorophyll Fluorescence in Detection Stress Condition in Plants // CRC Crit. Rev. Anal. Chem. 1988. V. 19. Suppl. 1. S. 29–85.
3. Кочубей С.М., Кобец Н.И., Шадчина Т.М. Спектральные свойства растений как основа методов дистанционной диагностики. Киев: Наук. думка, 1990. 136 с.
4. Gitelson A.A., Buschmann C., Lichtenthaler H.K. The Chlorophyll Fluorescence Ratio F_{735}/F_{700} as an Accurate Measure of the Chlorophyll Content in Plants // Remote Sensing of Environment. 1999. V. 69. № 2. P. 296–302.
5. Кочубей С.М., Шадчина Т.М., Одинокий Н.С. Проявление недостаточности азотного питания растений по спектральным характеристикам флуоресценции листьев // Физиол. биохим. культ. растений. 1986. Т. 18. С. 35–39.
6. Kyle D.J., Baker N.R., Arntzen C.J. Spectral Characterization of Photosystem I Fluorescence at Room Temperature Using Thylakoid Protein Phosphorylation // Photobiochem. Photobiophys. 1996. V. 37. № 2. P. 239–247.
7. Sonoike K. Photoinhibition of Photosystem I: Its Physiological Significance in the Chilling Sensitivity of Plants // Plant and Cell Physiol. 1996. V. 37. № 3. P. 239–247.

8. *Sonoike K.* The Different Roles of Chilling Temperatures in the Photoinhibition of Photosystem I and Photosystem II // *Photochem. Photobiol.* 1999. V. 48. № 1. P. 136–141.
9. *Agati G., Gezovic Z.G., Moya I.* The Effect of Decreasing Temperature up to Chilling Values on the in vivo F_{685}/F_{735} Chlorophyll Fluorescence Ratio in *Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum*: The Role of the Photosystem I Contribution to the 735 nm Fluorescence Band // *Photochem. Photobiol.* 2000. V. 72. № 1. P. 75–84.
10. *Асадов А.А., Котлярова Н.В., Зульфугаров И.С., Алиев Д.А.* Спектральные характеристики и ориентация нативных форм пигментов в хлоропластах проростков ячменя при непрерывном и прерывистом освещении // *Биофизика.* 1995. Т. 40. С. 245–251.
11. *Weston E., Thorogood K., Vinti G., Lopez-Juez E.* Light Quantity Controls Leaf-Cell and Chloroplast Development in *Arabidopsis Thaliana* Wild Type and Blue Light Perception Mutant // *Planta.* 2000. V. 211. № 2. P. 807–815.
12. *Zavoruev V.V., Zavorueva E.N., Shelegov A.V.* Fluorescence of Cucumber Leaves Induced within the Photoexcitation Wavelength Range 380–540 nm and Its Dependence on Vegetation Time and Illumination Regime // *Биофизика.* 2000. V. 45. № 5. P. 704–711.
13. *Strasser R.J., Schwarz B., Bucher J.B.* Simultaneous Measurement of Chlorophyll-Fluorescence Kinetics bei verschiedenen Wellenlängen als rascher Verfahren zur Ruhedianose von Immissionsbelastungen an Waldbäumen: Ozonwirkungen auf Buchen und Pappeln // *Eur. J. Forest Pathol.* 1987. V. 17. P. 149–153.
14. *Wintermans I.F., De Mots A.* Spectrophotometric Characteristics of Chlorophyll a and b and their Pheophytins in Ethanol // *Biochim. Biophys. Acta.* 1965. V. 109. P. 448–453.
15. *Rindler U., Schindler C., Lichtenthaler H.K.* The Laser-Induced Chlorophyll Fluorescence Ratio F_{690}/F_{735} of Spruce Needles and Beech Leaves During the Course of a Year // *Proc. of the 5th Intern. Colloquium – Physical Measurements and Signatures in Remote Sensing Courchevel.* France, 14–18 January 1991. P. 731–734.
16. *Гришин А.И., Матвиенко Г.Г., Харченко О.В., Тимофеев В.И., Клишкин В.М., Соколов В.Г., Астафурова Т.П., Зотикова А.П.* Дистанционная оценка состояния фотосинтетического аппарата в растениях методом индуцированной лазером флуоресценции // *Оптика атмосф. и океана.* 1999. Т. 12. № 4. С. 334–337.
17. *Воробьева Н.А., Гришин А.И., Зотикова А.П., Матвиенко Г.Г., Романовский О.А., Харченко О.В.* Применение эффекта лазерно-индуцированной флуоресценции для дистанционного исследования фотосинтетического аппарата растений // *Оптика атмосф. и океана.* 2000. Т. 13. № 5. С. 539–542.

E.N. Zavorueva, V.V. Zavoruev. **Concentration dependences of the red/far-red fluorescence ratio of chlorophyll in plants.**

The dependence of the F_{682}/F_{734} ratio on the chlorophyll concentration in plants grown under continuous light and natural photoperiod is studied. It is shown that the dependence of the F_{682}/F_{734} ratio on the chlorophyll concentration in plants grown under high-intensity continuous illumination is described by a parabolic function and in those under intermittent light – by the exponential function. The third type of the concentration dependence of the parameter F_{682}/F_{734} was obtained in leaves of poplar in the process of vegetation. The dependence has a complex character, and known functions fail to describe it. It is concluded that all the known dependences of the F_{682}/F_{734} ratio on the chlorophyll concentration correspond to particular conditions of plant growth. Now there is no universal function connecting the ratio between red and far-red fluorescence with the chlorophyll content in leaves. The results presented are well explained by the model, in which each photosystem emits at a fixed wavelength.