Аграрен университет - Пловдив АГРАРНИ НАУКИ Година II Брой 4 2010

DOI: 10.22620/agrisci.2010.04.002

ВЪЗМОЖНОСТИ НА НОВИЯ МУЛТИФУНКЦИОНАЛЕН АНАЛИЗАТОР НА ЕФЕКТИВНОСТТА НА РАСТЕНИЯТА ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА ФУНКЦИОНАЛНОТО СЪСТОЯНИЕ НА ФОТОСИНТЕТИЧНИЯ АПАРАТ MULTIFUNCTIONAL PLANT EFFICIENCY ANALYZER MPEA USED TO DESCRIBE THE PHYSIOLOGICAL STATES OF THE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS

Василий Голцев^{1*}, Иван Йорданов², Мария Гурманова¹, Маргарита Кузманова¹, Щерян Дамбов¹, Соня Апостолова¹, Гергана Савова¹, Рето Йорг Страсер³ Vasilij Goltsev^{1*}, Ivan Yordanov², Maria Gurmanova¹, Margarita Kouzmanova¹, Shteryan Dambov ¹, Sonia Apostolova¹, Gergana Savova¹, Reto Jorg Strasser³

¹СУ "Св. Климент Охридски", Биологически факултет, София
 ²Институт по физиология на растенията "Методи Попов", БАН, София
 ³Лаборатория по биоенергетика, Женевски университет, Женева, Швейцария
 ¹St. Kliment Ohridski University of Sofia, Faculty of Biology, Sofia, Bulgaria
 ²Methody Popov Institute of Plant Physiology, BAS, Sofia, Bulgaria
 ³Bioenergetics Laboratory, University of Geneva, Jussy-Geneva, Switzerland

*E-mail: goltsev@biofac.uni-sofia.bg

Резюме

Бързото развитие на молекулно-биологичните и молекулно-генетичните техники даде в ръцете на селекционерите инструмент за насочена модификация на растителния геном и за получаване на голям брой обекти с различни характеристики. В тези условия възниква основен проблем за успешна селекционна работа – бърз и ефективен подбор на перспективни образци с нужни полезни свойства. Фирмата Hansatech Instruments Lts. (Kings Lynn, UK) разработи нов инструмент, позволяващ бърз и много информативен анализ (*in vivo u in situ*) на функционалното състояние на фотосинтетичния апарат при растенията – mPEA (multifunctional Plant Efficiency Analyzer). Той се базира на едновременна регистрация на кинетичните характеристики на бързата (вариабилната) хлорофилна флуоресценция, забавената хлорофилна флуоресценция и модулираното разсейване при 820 nm в цели неоткъснати листа. На примера на анализа на листа от фасулеви растения в различно физиологично състояние контролни и декапитирани при появата на първи сложен лист) са представени информационните възможности на апарата. Описани са експериментални подходи за изучаване на състоянието на фотосинтетичния апарат и начини за изчисляване на важни структурни и функционални параметри, характеризиращи квантовата ефективност и скоростите на електрон-транспортните реакции във Фотосистема I и Фотосистема II.

Abstract

The rapid developments of molecular biological and molecular genetic techniques provide plant-growers with an instrument for target-oriented modifications of the plant genome and obtaining a large number of samples with different characteristics. Under these conditions a major problem for successful breeding work arises – a quick and efficient selection of promising samples with the needed useful properties. Hansatech Instruments Ltd (Kings Lynn, UK) developed a new tool - mPEA (multifunctional Plant Efficiency Analyzer) allowing for fast and very informative sub-millisecond time resolution analysis (*in vivo* and *in situ*) of the functional status of the photosynthetic apparatus in plants. It is based on a simultaneous signal 16-bit resolution registration of the kinetic characteristics of prompt chlorophyll fluorescence emission, delayed chlorophyll fluorescence and modulated light scattering and reflection of the actinic incident light at 820 nm. Leaves from bean plants at different physiological states (control and decapitated after the appearance of the first trifoliate leaf) have been analyzed. The prompt fluorescence signal provides information about electron transport fluxes through Photosystem II and Photosystem I. The modulated reflection signal at 820 nm provides information about the activity of the donor and acceptor side of Photosystem II presenting structural information as rate constants, related to the whole photosynthetic apparatus.

Ключови думи: фотосинтеза, хлорофилна флуоресценция, забавена флуоресценция, JIP тест, стрес при растения. Key words: photosynthesis, chlorophyll fluorescence, delayed fluorescence, JIP-test, plant stress.

УВОД

Всички представители на флората, притежаващи способност да фотосинтезират, при осветяване излъчват светлина (наречена в зависимост от начина на излъчване бърза флуоресценция, БФ или забавена флуоресценция, 3Ф), която носи богата информация за структурата и функциите на фотосинтетичния апарат (Strasser at al., 2004; Goltsev et al., 2009). След откриването на индукционните преходи (Kautski and Hirsch, 1931) и връзката им с промените в редокс състоянието на първия хинонов акцептор (Q_{Λ}) на Фотосистема II (ФС II) (Butler, 1972) БФ постоянно привлича интереса на изследователите като метод за изследване на фотосинтезата при нативни растения. Бяха разработени два основни подхода за регистрация на вариабилната флуоресцения - чрез амплитудна модулация на измерващия лъч (Schreiber et al., 1986) и чрез директна регистрация на сигнала на флуоресценцията, възбудена от актинична светлина (Strasser and Govindjee, 1991). На базата на тези подходи са създадени два основни типа флуориметри: флуориметър с амплитудна модулация РАМ (произвеждан от фирмата Walz, Germany) и оптикоелектронен флуориметър с директно осветяване и регистрация (PEA, Plant Efficiency Analyzer, произвеждан от Hansatech Instruments, Kings Lynn, UK). През последните две десетилетия двата метода активно се разработват и са произведени много модификации на апарати за анализ на растенията на базата на вариабилна хлорофилна флуоресценция.

Вторият вид излъчвана от растенията луминесценция, забавената флуоресценция, е открита от Стрелер и Арнолд през 1951 (Strehler and Arnold, 1951). Светлинните кванти на 3Ф се излъчват от хлорофилни молекули на ФС II, вторично възбудени в резултат на излъчвателната рекомбинация на зарядите в реакционния център (Lavorel, 1975; Malkin, 1978; Radenovich et al., 1994; Goltsev et al., 2009). Те носят информация както за директните, така и за обратните реакции на електронния пренос в донорната и акцепторната страна на ФС II. Поради ниската вероятност на обратните реакции интензитетът на 3Ф е изключително нисък (с няколко порядъка по-нисък от този на БФ). По време на осветяването на растенията излъчваните кванти на 3Ф не могат да бъдат различени от тези на БФ, което затруднява регистрацията на ЗФ. Това е една от основните причини досега да не се произвежда апаратура за измерване и анализ на забавената луминесценция, а изследванията й да се осъществяват с апаратура, разработена и изградена в

самите лаборатории. Всеки един такъв апарат бе уникален по отношение на функционалните параметри, поради което сравняването на резултатите, получени в различни лаборатории, бе затруднено. Първи прототип на стандартен апарат на базата на механичен фосфороскоп за едновременна регистрация на БФ и ЗФ бе разработен и произведен от фирмата ТЕСТ, Красноярск, Русия (Гаевски, Моргун, 1993; Zaharieva and Goltsev, 2003), но до серийно производство не се стигна.

Фирмата Hansatech Instrument на базата на тяхната серия флуориметри тип PEA създаде оптикоелектронен комбиниран уред с висока времева разделителна способност (сигналите се отчитат на всеки 10 µs) за едновременна регистрация на сигналите на БФ, 3Ф и разсейване при 820 nm – mPEA. Целта на настоящата работа е да се представят възможностите



Фиг. 1. Провеждане на експеримент с флуориметъра тРЕА върху неоткъснат първичен лист на декапитираното фасулево растение. Работната глава, закрепена на гъвкав статив, се разполага над горната повърхност на избрания лист. Обектодържателят се поставя върху листа за времето на тъмнинната адаптация (1 h), след което се свързва с работната глава и се провежда измерването на фотосинтетичните параметри. На задния фон зад декапитираното растение се виждат листа от контролно (недекапитирано) фасулево растение Fig. 1. Experimental setup for fluorescence measurement with mPEA fluorometer. Working head held on a flexible tripod, is placed over the upper surface of the selected attached primary leaf of decapitated bean plant. JIP transients are recorded after 1 h of dark adaptation in the clip. Behind the decapitated bean plant is control (non-decapitated) plant

на новия флуориметър от серията РЕА-флуориметри за анализ на физиологичното състояние на растенията, за изследване на стресовия отговор, в селекционната работа за скрининг на варианти при подбора на перспективни селскостопански култури с толерантен генотип.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Отглеждане на растенията

В експериментите са използвани цели 20-25дневни растения или откъснати листа от фасул (*Phaseolus vulgaris* L.), сорт "Черен старозагорски", отглеждани като водна култура в хранителен разтвор на Кноп във фитостатен бокс при температура 22-25°С, влажност 30-40%, денонощен режим светло/тъмно 12:12h и луминесцентно осветление с интензитет 250 µmol.s⁻¹.m⁻².

Бяха използвани листа от контролни растения и декапитирани (с премахване на апикалната пъпка) след появата на първи сложен лист (Yordanov et al., 2008).

Работа с mPEA

Едновременната регистрация на фотоиндуцираните сигнали на бързата и забавената хлорофилна флуоресценция и промените в поглъщането при 820 nm е провеждана с апарата M-PEA (Multifunctional Plant Efficiency Analyzer), разработен и произведен от Hansatech Instruments Ltd. (King's Lynn, Norfolk, UK) (вж. фиг. 1). Флуориметърът е пригоден за работа с нативни обекти - листа от висши растения, и не изисква откъсването на лист от растението. Обектодържателят, предназначен за затъмняване на обекта, представлява лека пластмасова щипка. Листът се притиска с мека еластична черна гумирана пластина към отвора, през който се осветява, и се регистрират излъчените от обекта светлинни кванти. Клипът фрикционно се закрепва пред прозореца на работната глава, осигурявайки светлоизолация на обекта и на светлочувствителните фотодиоди от външна разсеяна светлина. За по-добра светлохерметичност обектодържателят е изработен от черна пластмаса. За възбуждане на БФ и ЗФ обектът се осветява с червена $(\lambda \approx 650 \text{ nm})$ фотосинтетично активна светлина, излъчвана от свръхярък светодиод и фокусирана с леща върху работния отвор на обектодържателя. Максималният интензитет на нивото на повърхността на обекта е 5000 µmol.m².s⁻¹. По-подробно принципът на работа на апарата е описан в предишна статия (Strasser et al., 2010).

Едновременната регистрация на БФ и ЗФ изисква редуването на периоди на осветяване и затъмняване на обекта, през които се регистрират двата типа сигнали – съответно бърза и забавена флуоресценция. За получаване на индукционни криви (ИК) на БФ, максимално приближени към кривата, която се регистрира с постоянно възбуждане, е необходимо намаляване на относителния дял на тъмнинните периоди при квазистационарното осветяване. Във флуориметъра М-РЕА се реализира схема, при която делът на тъмнинните интервали не надвишава 1/3 от светлинните (т.е. 25% от регистрационното време).

Едновременно с регистрацията на бързата и забавената хлорофилна флуоресценция флуориметърът mPEA може да записва промените в поглъщането при 820 nm. Те се регистрират в режим на анализ на разсеяната светлина (reflection mode). При фотоиндуцирано повишаване на поглъщането делът на разсеяната светлина намалява, по което може да се съди за промените в концентрацията на окислените състояния на преносителите във ФС I – хлорофила на реакционния център (P₇₀₀⁺) и пластоцианина (PC⁺) (Shansker et al., 2003).

Последователността на периодите на осветяване/тъмнина, видът на светлинния източник и интензитетът на светлината при осветяването се задават чрез предварително зареден в апарата протокол, който се приготвя от оператора с помощта на приложения софтуер. След измерването числените данни се зареждат в компютър. За вторичен анализ на данните бе използван специализиран софтуер "DF analyzer 4.4.2", разработен в Катедрата по биофизика и радиобиология на Биологическия факултет в СУ "Св. Кл. Охридски".

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Важно предимство на новия апарат за луминесцентни измервания е възможността върху един обект да бъдат наблюдавани едновременно няколко луминесцентни и оптични характеристики: интензитет на бързата хлорофилна флуоресценция, интензитет на забавената флуоресценция, регистрирана в различни времеви диапазони на тъмнинна релаксация, и фотоиндуцирани промени в разсейването на модулираната светлина с λ = 820 nm (вж. фиг. 2). Трите вида сигнали показват характерни промени при осветяване на обекта с фотосинтетично активна светлина, които отразяват протичащите в растителната клетка фотоиндуцирани реакции и процеси. Сравняването на динамиката на трите сигнала позволява по-достоверна интерпретация на данните.

Хлорофилна флуоресценция

Един основен подход за получаване на информация за състоянието на фотосинтетичния апарат от хлорофилната флуоресценция се заключава в числен анализ на параметрите на индукционния преход при осветяване на тъмнинноадаптирани



Φuz. 2. Типичен запис на едновременно регистрираните индукционни криви на бързата флуоресценция (БΦ), сигнала на модулираното разсейване при 820 nm (MP₈₂₀) и забавената флуоресценция (3Φ), регистрирана в 5 времеви диапазона.
 Записът е направен на тъмнинноадаптирано (60 min) контролно фасулево растение при интензитет на възбуждането 3000 μmol.m².s⁻¹. С големи празни кръгчета са отбелязани характеристичните точки на ИК на БФ (F_o, F_p, F_p, F_p) и на 3Ф (I₁ ÷ I₂)
 Fig. 2. Typical experimental protocol for simultaneous record of induction curves of prompt fluorescence (PF), signal of reflection of modulated light at 820 nm (MR₈₂₀) and delayed fluorescence (DF) registered at 5 time intervals. The record was made using dark adapted (60 min) leaf from control bean plant at actinic light intensity of 3000 μmol.m⁻².s⁻¹. With the large empty circles the fluorescence values in characteristic points of fluorescence transient (F_o, F_p, F_p, F_m) and DF induction curves (I₁ ÷ I₂) are marked

растения. Страссер е разработил теория на енергетичните потоци при фотосинтезата (Strasser, 1978), на базата на която е създаден JIP тест, позволяващ от интензитета на флуоресценцията в различни моменти на прехода от тъмнинноадаптирано към светлинно състояние да се изчисляват важни характеристики на фотосинтетичния апарат (Strasser et al., 1995, 2004, 2010; Tsimilli-Michael and Strasser, 2008).

При осветяване на тъмнинноадаптиран фотосинтезиращ обект с фотосинтетично активна светлина в течение на една секунда интензитетът нараства от минималната начална стойност, обозначавана като F_o, до максимална F_м, преминавайки през междинни фази със стойности F, и F.

Типична полифазна *O-J-I-P* крива на нарастването на хлорофилната флуоресценция е представена на полулогаритмична времева скала от 50 µs до 1 s (фиг. 2 и 3). Характеристичните стойности на флуоресценцията, обозначени с буквите J, I и P, се използват в JIP теста за пресмятане на структурни и функционални параметри. Използваните флуоресцентни стойности са F_0 (50 µs), F_J (2 ms), F_I (30 ms) и максималният интензитет $F_P = F_M$ (в момент t_{Fmax}). Възможностите за получаване на информация за състоянието на ФСА от формата на индукционната крива са обобщени в табл. 1.

Приложихме JIP тест за анализ на физиологичното състояние на фотосинтетичния апарат в листа от фасулеви растения. Сравнихме резултатите за листа от контролни растения (вж. фиг. 1) и първични листа от растения, декапитирани след появата на първия сложен лист. Резултатите са представени в таблица 2.

Данните показват, че в първичните листа от декапитираните растения активността на ФСА по всички изследвани параметри достоверно надвишава тези при контролните. Общата ефективност на трансформацията на енергията е над три пъти повисока в декапитираните листа. Параметърът RC/ABS показва, че при тях има с около 30% повече активни реакционни центрове на единица хлорофилна концентрация и се формират с около 20% повече електронни преносители (PQ пул и NADP), които обслужват всеки реакционен център. Причината за това може да бъде забавеното стареене на растителните клетки в декапитираните листа (Yordanov et al., 2008). Таблица 1. Основни информативни параметри на базата на JIP теста и начини за изчисляването им Table 1. Main informative parameters of JIP-test and formulas for their calculation

Регистрирани параметри						
Параметър	Регистрира се	Какво означава, каква е получаваната информация				
Fo	на 20 µs	Ниво на Фл, когато Q _A е окислен (отворено състояние на РЦ на ФС II). Пропорционално е на хлорофилната концентрация				
F _K	на 300 µs	Преходно ниво, отразяващо скоростта на дониране на електрона към Р ₆₈₀ . При забавяне на				
FJ	на 2 ms	преноса нараства				
F,	на 30 ms	Ниво на Фл, когато скоростта на улавянето на енергията на възбуждането в отворените РЦ на ФС II се изравнява със скоростта на реокислението на Q _A ⁻ от вторичните електронни				
		акцептори (
$F_M = F_P$	Ha ~300 \div 700 ms	Ниво на Фл, когато скоростта на улавянето на енергията на възбуждането в отворените РЦ на ФС II се изравнява със скоростта на				
Area	$\sum_{t=t_M} (F_M - F_t) \cdot \Delta t$	реокислението на PQ.H ₂ от ФС I				
		Ниво на Фл, когато Q _A е редуциран (затворено състояние на РЦ на ФС II)				
		Максимална комплементарна площ над индукционната крива до ниво <i>F</i> = <i>F_M</i>				
	Изчисля	авани параметри				
Параметър	Формула	Какво означава, каква е получаваната информация				
Fu	$F u \equiv F_{t} - F_{0}$	Вариабилна Фл в момент <i>t</i> на регистрация на индукционната крива				
F_V	$F_V \equiv F_M - F_o$	Максимална вариабилна флуоресценция				
Sm	$Sm = Area/F_V$	Нормализирана площ над индукционната крива				
V _t	$V_t \equiv F_v / F_V \equiv \frac{F_t - F_o}{F_M - F_o}$	Относителна вариабилна флуоресценция в момент <i>t</i>				
Mo	$M_{o} = \frac{(\Delta F / \Delta t)_{o}}{F_{M} - F_{50\mu s}}$ $= \frac{4 \cdot (F_{300\mu s} - F_{50\mu s})}{F_{M} - F_{50\mu s}}$	Апроксимиран начален наклон на индукционната крива (в ms ⁻¹). Пропорционален на скоростта на първичната фотохимична реакция в РЦ на ФС II				

(продължава на стр. 20)

(продължава от стр. 19)

Биофизични параметри							
Параметър	Формула	Какво означава, каква е получаваната информация					
$arphi_{Po}$	$\varphi_{Po} = \frac{F_M - F_0}{F_M}$	Максимален квантов добив на първичната фотохимична реакция					
$arphi_{Eo}$	$\varphi_{Eo} = \frac{F_M - F_J}{F_M}$	Квантов добив на електронния транспорт след Q _A – отразява вероятността, с която уловеният квант ще задвижи електронния транспорт след Q _A					
$arphi_{_{Ro}}$	$\varphi_{Ro} = \frac{F_M - F_I}{F_M}$	Квантов добив на електронния транспорт след PQ – отразява вероятността, с която уловеният във ФС II квант ще предизвиква електронен транспорт от PQ през ФС I към акцепторите на ФС I					
EC RC	$\frac{EC}{RC} = Sm = Area/F_v$	Брой на електронните преносители (ЕС) в електрон-транспортната верига от ФС II до акцепторите на ФС I Изчислява се като брой на електроните, подадени в електрон-транспортната верига от РЦ на ФС II за пълна редукция на преносителите					
ABS	$\frac{RC}{ABS} = \varphi_{Po} \frac{V_J}{M_0}$	Относителен брой на Q _A -редуциращите РЦ на ФС II на единица от антенния хлорофил на ФС II Служи за мярка на активните реакционни центрове					
PI _{ABS}	$PI_{ABS} = \frac{RC}{ABS} \cdot \frac{\varphi_{Po}}{1 - \varphi_{Po}} \cdot \frac{\varphi_{Eo}}{1 - \varphi_{Eo}}$	Индекс на производителност – потенциал за превръщане на енергията на погълнатия във ФС II светлинен квант в окислително- редукционна енергия на електронните акцептори. Служи за мярка на активността на ФС II и междусистемната електрон- транспортна верига					
PI _{total}	$PI_{total} = PI_{ABS} \cdot \frac{\varphi_{Ro}}{1 - \varphi_{Ro}}$	Тотален индекс на производителност – потенциал за превръщане на енергията на погълнатия във ФС II светлинен квант в окислително-редукционна енергия на електронните акцептори на ФС I. Служи за мярка на сумарната активност на ФС II, ФС I и междусистемната електрон-транспортна верига					

Таблица 2. Сравняване на фунционалните параметри на фотосинтетичния апарат в листа от декапитирани и недекапитирани (контролни) фасулеви растения, оценявани по параметрите на JIP теста

 Table 2. Functional photosynthetic characteristics in leaves from control and decapitated bean plants, monitored

 by JIP-test parameters

	Декапит	гирани	Контролни			
		± стд.		± стд.		
Параметър	Средна ст.	грешка	Средна ст.	грешка		
φ_{Po}	0.763	0.002	0.747	0.003		
φ_{Eo}	0.495	0.016	0.370	0.013		
Φ_{Ro}	0.172	0.010	0.109	0.004		
PIABS	3.92	0.487	1.38	0.113		
Pltot	2.13	0.314	0.576	0.044		
EC/RC	37.6	0.5	31.3	1.1		
RC/ABS	0.615	0.041	0.465	0.009		

Стойностите са осреднени от 6 измерения



Фиг. 3. Схема, интерпретираща параметрите на JIP теста. Горе – схема на линейния електронен пренос в двете фотосистеми. Р₇₀₀ и Р₆₈₀ са хлорофили на реакционните центрове на ФС I и ФС II; Pheo, Q_A, Q_B PQ, Cyt b/f и Acc са последователни електронни преносители съответно във ФС II, между двете фотосистеми и в акцепторната страна на ФС I. Хоризонталните стрелки показват посоката на електронния пренос, а вертикалните свързват определените фази на индукционната крива с конкретни реакции на електронния пренос. Долу – типична индукционна крива на хлорофилна флуоресценция. С буквите F₀, F₁, F₁ и F_M са обозначени нивата на излъчване на флуоресценцията в характеристичните точки на кривата О, J, I и Р. Дължината на вертикалните светлосиви линии отбелязва относителните дялове на енергията, използвана за задвижване на електрон-транспортните реакции в съответния участък на електрон-транспортната верига, спрямо общия поток на енергията, поглъщана във ФС II (черна вертикална линия). От съотношенията на дължините на линиите (сивата към черната) се изчисляват квантовите

добиви на електрон-транспортните реакции в съответните участъци на веригата (съответно φ_{P_0} , φ_{E_0} и φ_{R_0})

Fig. 3. Simplified scheme explaining parameters of the JIP-test. Up – a linear scheme of electron transport in both Photosystems. P_{700} and P_{600} are the chlorophylls of the PS I and PS II reaction centers; Pheo, $Q_{A'}, Q_{B'}, PQ$, Cyt b/f and Acc are successive electron carriers in PS II, between the two Photosystems and PS I acceptor side, respectively. Horizontal arrows show the direction of electron transport, vertical arrows link definite phases of induction curve with specific sites of electron transport. Below - typical induction curve of chlorophyll fluorescence. In letters $F_{o'}, F_{J'}, F_{I}$ and F_{M} indicate the levels of fluorescence emission at the characteristic points of the curve O, J, I and P (M). The length of the vertical grey lines represent the relative part of energy used to drive electron transport reactions in the corresponding site of the electron transport chain, as compare to the total flow of absorbed in PS II energy (black vertical lines). From the ratios of line lengths (grey to black) the quantum yields of electron transport

reactions in the definite sites of the chain are calculated (φ_{P_0} , φ_{E_0} and φ_{R_0} , respectively)

Друг продуктивен подход за анализ на резултатите от индукционните преходи на хлорофилната флуоресценция, който е добре приложим при анализ на стресови ефекти, е представянето на криви, нормирани в две точки, например при F_o и при $F_{M'}$ и пресмятане на диференциална крива, показваща разликата между F_t (стресирана проба) и F_t (контрола). На фиг. 3 са показани времеви функции, представляващи разликите между флуоресцентния сигнал в листа от декапитирани фасулеви растения, третирани различно време с повишена температура, и в контролни листа.

В диференциалните криви на обработените при температура 50°С листа се появява изразен максимум при около 300 µs (фиг. 4, фиг. 6). Височината на пика практически монотонно нараства с увеличаване на продължителността на третирането. Този максимум очевидно представлява термоиндуцирана поява на К пика, който се свързва с инактивация на водоразцепващия комплекс във ФС II (Strasser, 1997). Смята се, че забавянето на дониране на електрони към Р680⁺ при функционираща акцепторна страна на ФС II води до формиране на относително високи



Фиг. 4. Диференциални индукционни криви, представящи промени в хлорофилната флуоресценция, индуцирани от третиране с 50°С. Листните дискове от декапитираните фасулеви растения след 1 h тъмнинна адаптация се поставят върху метална пластина с контролирана температура (50°С) и след определено време се измерва индукционната кинетика на хлорофилната флуоресценция. Интензитетът на възбуждащата светлина е 5000 µmol.m⁻².s⁻¹ Fig. 4. Differential induction curves presenting changes in chlorophyll fluorescence that are induced by 50°C treatment bean leaf. 1 h dark adapted segments of primary leaf from decapitated bean plant were placed on metal plate with controlled temperature of 50°C and after definite time (showed in the legend) the induction curve of chlorophyll fluorescence was recorded at actinic light intensity of 5000 µmol.m⁻².s⁻¹

концентрации на катион-радикала на хлорофила на реакционния център (в рамките на първите 300 µs), който е активен гасител на възбудените състояния на хлорофила и оттам – до намаляване на интензитета на флуоресценцията. Освен на този ефект отрицателният сдвоен пик при около 10 и 50 ms може да се дължи още и на термоиндуцирано ускоряване на електронния пренос както при непосредственото реокисляване на Q_{A}^{-} от подвижните хинони (Q_{B} и PQ), така и при окислението на PQ.H₂ от ФС I.

Разсейване при 820 nm

По време на индукционния период сигналът на разсейването на модулираната светлина с λ = 820 nm претърпява характерни промени, отразяващи измененията в редокс-състоянието на хлорофила на реакционния център на ФС I – Р₇₀₀, и на електронния донор – пластоцианин (Schansker et al., 2003) (вж. фиг. 2). Намаляването на сигнала на MR₈₂₀ 1 ms след началото на осветяването е свързано с бързото окисляване на Р₇₀₀ на светло, тъй като през този период пластохиноновият пул е окислен и не може да компенсира възникващия електронен дефицит във ФС I. Към 30^{тата} ms на индукцията ФС II редуцира PQ-пул и той започва да донира електрони към Р700⁺ и да го редуцира, което корелира с бавно покачване на сигнала на MR₈₂₀ (фиг. 2). Процесът продължава, докато има окислени молекули – електронни акцептори на ФС I.

При нарушаване на реакциите по електронния пренос в и около ФС I индукционната крива на MR₈₂₀ се променя по характерен начин. На фиг. 5 са представени фотоиндуцираните преходи в сигнала MR₈₂₀, измерени в листа от фасул, засушавани различно време. Развиващият се воден дефицит в растителната клетка се отразява предимно върху бавната фаза на нарастването на сигнала. Това означава, че засушаването инхибира предимно преноса на електрони към ФС I, без да засяга съществено функционирането на реакционния й център.

Забавена флуоресценция

Един допълнителен източник на информация за реакциите по време на светлинната фаза на фотосинтетичния процес е забавената флуоресценция, излъчвана в субмилисекунден и милисекунден диапазон (вж. Goltsev et al., 2009, и цитатите в него). Светлинните кванти на 3Ф се излъчват от хлорофилните молекули на антенните комплекси на ФС II, които са вторично възбудени в резултат на рекомбинация на разделените заряди в реакционния център. 3Ф, излъчвана в 10 µs ÷ 10 ms времеви диапазон на регистрацията, се дължи на обратния пренос на електрони от редуцирания акцептор (Q_{A}^{-}) към окисления донор (Z^{+}), а кинетиката на тъмниния спад на 3Ф се определя от скоростите на



Фиг. 5. Фотоиндуцирани промени в разсейването при 820 пт, регистрирани в откъснати листа от фасулеви растения, засушавани различно време при температура 20-22°С и въздушна влажност 40-50%

Fig. 5. Light induced changes in modulated reflection at 820 nm, registered in detached leaves of bean plants, dried different times at 20-22°C and air humidity of 40-50%



Фиг. 6. 3D представяне на едновременно регистрираните индукционни криви и кинетики на тъмнинна релаксация на 3Ф в листа от контролни (недекапитирани) растения от фасул. Листата са тъмнинноадаптирани в течение на 1 h, след което спадовете на 3Ф са записвани в различни моменти от индукционния период

Fig. 6. 3D view of simultaneously registered induction curves and dark decays of DF in leaves of control (non-decapitated) bean plants. The leaves were dark adapted during 1 h and then the dark decays at different moments of induction period are recorded окислително-редукционните реакции, стабилизиращи тези заряди.

Затова чрез анализа на кривите на тъмнинната релаксация на 3Ф може да се определят скоростните константи на реакциите, стабилизиращи разделените заряди около РЦ на ФС II. Амплитудите на кинетичните компоненти на 3Ф се определят от концентрациите на светещите състояния на РЦ, а характеристичните времена на спадовете са обратнопропорционални на скоростните константи на реакциите, водещи до дисипация на тези състояния (Goltsev et al., 2009).

Фигура 5 в тримерна графика представя едновременно релаксационните спадове на 3Ф (лявата долна ос), измерени при различна продължителност на осветяването, и индукционни криви (проектирани върху равнината DF intensity vs. JIP time), пресметнати за различни интервали на регистрацията. Предимството на този начин на представяне е, че позволява в огромния масив от данни веднага да се локализират специфичните промени, които са резултат например на стресово въздействие.

По време на индукционния преход се променят не само амплитудите на кинетичните компоненти и тяхното съотношение, а също и скоростите на спадовете на всяка компонента.

Стресовите въздействия по сложен начин модифицират 3Ф и нейните компоненти, оказвайки влияние както върху амплитудите, така и върху характеристичните времена. Инкубацията на листни дискове от фасулеви растения при повишена температура променя формата на ИК на 3Ф и на релаксационната й кинетика. На табл. 3 са представени данни за влияние на 1- и 2-min инкубация на листни дискове от декапитирани фасулеви растения при 50 °C върху параметрите на кинетиките на тъмнинната релаксация на 3Ф. Данните показват, че началните фази на индукционния преход са по-чувствителни към високотемпературното въздействие. Амплитудата на първия регистриран след 2 ms осветяване (когато настъпва фазата J на БФ) компонент на 3Ф с времеживот т, = 19 µs намалява двойно, а скоростта на спада се забавя с около 30% след 2 min нагряване. Още по-драстично намалява амплитудата на втория компонент L₂.

В периода на формирането на фазата / на БФ нагряването силно ускорява спада на 3Ф във втория компонент T_2 . Изхождайки от предположението, че 20-30 µs 3Ф компонент отразява реакции в донорната страна на ФС II по стабилизирането на заряда на преносителя Z⁺, а 200–300 µs 3Ф компонент е свързан със стабилизация на заряда на Q_A^- от Q_B (Goltsev et al., 2009), представените в табл. З резултати може да се интерпретират по следния начин: слаб високотемпературен стрес потиска реакциите в донорната

Таблица 3. Влияние на продължителността на третирането с висока температура върху параметрите на тъмнинната релаксация на 3Ф. След 1 h тъмнинна адаптация листни дискове от декапитираните растения от фасул са поставяни върху метална пластина, поддържаща температура 50°С, и след инкубация 1 или 2 min е измервана 3Ф при интензитет на възбуждащата светлина 5000 μmol.m⁻².s⁻¹

Table 3. Effect of high temperature treatment duration on DF dark relaxation parameters. The leaves were dark adaptedduring 1 h and then are treated at 50°C for 1 or 2 min. DF dark decays at at different moments of induction period (J, I

t,	J		1			Р					
min											
	L ₁	T ₁	L_2	L ₁	T ₁	L_2	T ₂	L ₁	T ₁	L_2	T ₂
0	23829	0.019	6001	17239	0.023	6607	0.302	7387	0.022	2479	0.269
1	26159	0.021	1939	41197	0.024	3279	0.185	17507	0.027	1901	0.389
2	12856	0.026	1747	20631	0.028	6180	0.094	16178	0.028	2116	0.328

and P) are recorded at actinic light intensity of 5000 µmol.m⁻².s⁻¹

страна на ФС II, но ускорява преноса на електрони между Q_A^- и Q_B^- , а в редуцирано състояние на преносителите в електрон-транспортната верига стресът забавя реакциите както в донорната, така и в акцепторната страна на ФС II.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализирани са информационните възможности за приложение на новия многофункционален флуориметър mPEA за окачествяване на състоянието на растения. Подбрани са информационни показатели, параметри на JIP теста, кинетики на 3Ф, фази на фотоиндуцираните промени в MP₈₂₀, обхващащи широк спектър характеристики в светлинната фаза на фотосинтезата, които могат да се използват като основа за оценка на стресовата реакция в растението и за създаване на ефективни критерии за толерантността на растението към прилагания стрес.

ЛИТЕРАТУРА

- Гаевский, Н. А., Моргун В. Н., 1993. Исползование переменной и замедленной флуоресценции хлорофилла для изучения фотосинтеза растений. – Физиология растений, 40: 136–145.
- *Butler, W. L.*, 1972. On the primary nature of fluorescence yield changes associated with photosynthesis. In: Proc Natl Acad Sci USA, 69:3420–3442.
- Goltsev, V., Zaharieva I., P. Chernev and R. Strasser, 2009. Delayed fluorescence in photosynthesis. – Photosynth Res, 101:217-232.
- Kautsky, H., Hirsch A., 1931. Neue Versuche zur Kohlensguereassimilation. – Naturwissenshaften, 48: 964.
- Lavorel, J., 1975. Luminescence. In: Govindjee (ed) Bioenergetics of photosynthesis. Academic Press, New York, pp. 223–317.

- Malkin, S., 1979. Delayed luminescence. In: Trebst A, Avron M (eds) Photosynthesis I. Photosynthetic electron transport and photophosphorilation. Acad. Press, NY, pp 473–491.
- Radenovic, C., Markovic D., Jeremic M, 1994. Delayed chlorophyll fluorescence in plant models. – Photosynthetica, 30: 1–24.
- Schansker, G., Srivastava A., Govindjee, Strasser R. J., 2003. Characterization of 820 nm transmission induction curves in pea leaves: kinetic separation between plastocyanin and P700 contributions. – Funct. Plant Biol. 30: 1–10.
- Schreiber, U., Schliwa U., Bilger W., 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorimeter. – Photosynth. Res., 10: 51–62.
- Strasser, B. J., Strasser R. J., 1995. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP test. – In: P. Mathis (Ed.), Photosynthesis: from Light to Biosphere: Proceedings of the Xth International Photosynthesis Congress, Montpellier-France 1995, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, vol. V, pp. 977–980.
- Strasser, R. J., Srivastava A., Govindjee, 1995. Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. – Photochem. Photobiol., 61: 32–42.
- Strasser, R. J., 1978. The grouping model of plant photosynthesis. – In: G. Akoyunoglou (Ed.), Chloroplast Development, Elsevier, North Holland, pp. 513–524.
- Strasser, R. J., Srivastava A., Tsimilli-Michael M., 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. – In: M. Yunus, U. Pathre, P. Mohanty (Eds.), Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation, Taylor and Francis, London, UK, pp. 443–480.
- Strasser, R. J., Tsimilli-Michael M., Qiang S., Goltsev V., 2010. Simultaneous in vivo recording of prompt and

delayed fluorescence and 820 nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. – BBA, 1797: 1313-1326.

- Strasser, R. J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A., 2004. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. – In: G.C. Papageorgiou, Govindjee (Eds.), Advances in Photosynthesis and Respiration Series (Govindjee – Series Editor), Chlorophyll a Fluorescence: a Signature of Photosynthesis, vol. 19, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 321–362.
- Strehler, B. L., Arnold W., 1951. Light production by green plants. J. Gen. Physio, 34: 809–820.
- Tsimilli-Michael, M., Strasser R. J., 2008. In vivo assessment of plant's vitality: applications in detecting and evaluating the impact of Mycorrhization on host plant's. – In: A. Varma (Ed.), Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics, 3rd edition, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 679–703.
- Yordanov, I., Goltsev V., Stefanov D., Chernev P., Zaharieva I., Kirova M., Gecheva V., Strasser R. J., 2008.

Preservation of PS II Electron Transport from Senescence-Induced Inactivation in Primary Leaves after Decapitation and Defoliation of Bean Plants. – J. Plant Physiol., 165 (18): 1954-1963.

Zaharieva, I., Goltsev V., 2003. Advances on Photosystem Il investigation by measurement of delayed chlorophyll fluorescence by a phosphoroscopic method. – Photochem. Photobiol. 77(3): 292-298.

Работата е изпълнена благодарение на финансовата подкрепа на Националния фонд за научни изследвания (проект № DO 02-137/ 15.12.2008).

Статията е приета на 12.07.2010 г. Рецензент – доц. д-р Невена Стоева E-mail: stoeva_au_bg@yahoo.ca