

ПАРАМЕТРЫ ИНДУКЦИОННЫХ КРИВЫХ БЫСТРОЙ И ЗАМЕДЛЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ, И РЕДОКС-СОСТОЯНИЯ ФС I – P700 ЛИСТЬЕВ БЕРЕЗЫ И ЛИПЫ В РАЗЛИЧНЫХ ГОРОДСКИХ УСЛОВИЯХ

© 2023 г. Д. А. Тодоренко^a, О. В. Яковлева^a, *, А. А. Алексеев^b, Д. Н. Маторин^a

^a Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова”, Москва, Россия

^b Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова”, Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия

*e-mail: oolga.yakovleva@gmail.com

Поступила в редакцию 28.02.2023 г.

После доработки 30.03.2023 г.

Принята к публикации 30.03.2023 г.

Исследованы фотосинтетические характеристики листьев липы (*Tilia cordata* L.) и березы (*Betula verrucosa* L.), растущих вблизи городских магистралей г. Москвы (МКАД, Московская кольцевая автодорога) с помощью одновременной регистрации индукционных кривых флуоресценции хлорофилла и редокс-состояния пигмента ФС I – P700. У деревьев близ магистралей выявлено ухудшение электронного транспорта на уровне пластохинонов (δ_{Ro}) и снижение скорости восстановления P700⁺, несмотря на достаточно высокие показатели фотосинтетической эффективности (F_v/F_m). У листьев березы, растущих вдоль МКАД, выявлено снижение оттока электронов от ФС I и уменьшение интенсивности замедленной флуоресценции при 30 мс и 1 с, связанной со снижением электрической и химической составляющих электрохимического градиента протонов на фотосинтетических мембранах. У растений около автомобильных магистралей отмечено повышение степени фотоингибирования и замедление реакций восстановления фотосинтетической активности в темноте после прекращения фотоокислительного стресса, что подтверждает вероятное влияние неблагоприятных городских условий на биосинтез белков реакционных центров ФС II. В качестве индикаторов состояния деревьев в городской среде предложены следующие параметры флуоресценции: общий индекс производительности (PI_{total}) и квантовый выход восстановления акцепторов электрона на акцепторной стороне ФС I (ϕ_{Ro}).

Ключевые слова: *Betula verrucosa*, *Tilia cordata*, антропогенная нагрузка, загрязнения, флуоресценция хлорофилла, фотосистемы I и II

DOI: 10.31857/S0015330323600171, EDN: AZOVSM

ВВЕДЕНИЕ

Возрастающая загруженность городских магистралей автомобильным транспортом ухудшает состояние городской растительности. Зеленые насаждения играют важную роль в ландшафте современного города – увлажняют и очищают воздух фитонцидами. Загрязнение воздуха и почвы воздействует на состояние растений, что приводит к ухудшению их фотосинтетических характеристик [1–5].

Сокращения: ЗФ – замедленная флуоресценция, МКАД – Московская кольцевая автодорога, ABS – поглощение (*absorption*), MR – модулированное отражение (*modulated reflection*), RC – реакционный центр (*reaction center*), RE – восстановление конечных акцепторов в ФС I (*reduction of end acceptors in PS I*), PI – индекс производительности (*performance index*).

Фотосинтетический аппарат растений представляет собой сложноорганизованную систему, в которой функционируют различные пигмент-белковые комплексы, белковые комплексы, переносчики электронов и протонов [6]. Поглощенная энергия пигментами антенных комплексов фотосистем II (ФС II) и I (ФС I) используется для переноса электронов по фотосинтетической ЭТЦ для образования НАДФН и АТФ, которые в дальнейшем участвуют в темновых реакциях фотосинтеза.

Известно, что фотосинтетический аппарат растений чрезвычайно чувствителен к воздействию экологических факторов, в том числе и антропогенных [7]. В связи с этим фотосинтетический аппарат городских насаждений может выступать в качестве индикатора состояния городской среды. Наруше-

ния в функционировании фотосинтетического аппарата могут быть выявлены с помощью различных методов регистрации флуоресценции хлорофилла [8, 9].

В настоящее время флуоресценция хлорофилла широко используется для оценки активности фотосинтетического аппарата растений и водорослей [10]. Данный метод обладает высокой чувствительностью, производительностью, а также доступностью портативных приборов, которые могут быть использованы непосредственно в полевых условиях *in situ*, что очень важно для решения различных экологических задач [11–14]. Флуоресценцию хлорофилла обычно индуцируют актиничным насыщающим светом и определяют значения — F_0 (начальная флуоресценция) и F_M (максимальная флуоресценция), из которых рассчитывают часто используемый параметр F_V/F_M — максимальный квантовый выход первичной фотохимической реакции в ФС II [8]. Регистрируя индукционные кривые флуоресценции хлорофилла, можно получить информацию не только о событиях, протекающих в ФС II, но и в ее окружении [9, 15, 16]. Индукционная кривая флуоресценции хлорофилла или ОЖР-кривая отражает последовательный переход фотосинтетической ЭТЦ из окисленного (О, F_0) в полностью восстановленное состояние (Р, F_M) через основные промежуточные стадии J и I. Начальная фаза OJ соответствует значительному восстановлению акцепторной стороны ФС II, в то время как последующая фаза JP отражает последовательное восстановление пула пластохинонов (PQ) и переносчиков электронов за пределами пула PQ [16]. Функциональное состояние ФС I оценивается путем регистрации отражения при 820 нм, которое связано с окислительно-восстановительными переходами P700, димера реакционного центра ФС I, и пластоцианина, вовлеченного в перенос электрона от цитохромного b_6/f комплекса к ФС I [17]. По замедленной флуоресценции оценивается энергизация тилакоидных мембран, т.е. светоиндуцированное образование мембранного потенциала и трансмембранного градиента протонов (ΔpH) на тилакоидных мембранах [7, 17].

Ранее исследователями изучались изменения фотосинтетических характеристик по флуоресценции хлорофилла у растений вблизи транспортных магистралей [1, 2, 18]. Несмотря на имеющиеся данные, которые в основном сосредоточены на исследовании активности ФС II, отсутствуют данные о характеристике процессов, протекающих в ФС I и между фотосистемами, а также об уровне энергизации мембран у таких деревьев вблизи транспортных магистралей.

Одним из факторов, влияющих на состояние городских насаждений вдоль транспортных магистралей, является повышенное содержание тяже-

лых металлов от автомобильного транспорта. Известно, что соли тяжелых металлов могут существенно нарушать процесс фотосинтеза растений [19, 20]. Ранее мы проводили детальные исследования воздействия ряда тяжелых металлов на фотосинтетические характеристики листьев высших растений с помощью многофункционального анализатора растений M-PEA-2 [21, 22]. В настоящей работе представляло интерес сравнить эти данные с результатами влияния загрязнений на городские растения при регистрации флуоресценции хлорофилла *a* на том же приборе M-PEA-2.

Целью данной работы явилось изучение состояния ФС II и ФС I и электрон-транспортных процессов между фотосистемами, а также уровня энергизации тилакоидных мембран листьев древесных растений, произрастающих рядом с Московской кольцевой автодорогой (МКАД), с помощью одновременной регистрации индукционных кривых быстрой и замедленной флуоресценции, и регистрации модулированного отражения при 820 нм. Полученные данные позволили определить мишени преимущественного воздействия городских условий на первичные фотохимические реакции фотосинтеза и выявить наиболее чувствительные параметры флуоресценции хлорофилла *a* для экспресс-мониторинга физиологического состояния деревьев.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были выбраны листья деревьев липы мелколистной (*Tilia cordata* L.) и березы бородавчатой (*Betula verrucosa* L.), растущих вдоль МКАД (5 м от дороги). Географические координаты (широта, долгота) местопроизрастания исследуемых деревьев: липа — (55.593747, 37.521393)—(55.594400, 37.518640); береза — (55.593814, 37.518609)—(55.594303, 37.516385). Контролем были выбраны деревья из Ясеневого лесопарка: липовая аллея — (55.597832, 37.515994)—(55.597276, 37.516877); березовая аллея — (55.597184, 37.516734)—(55.597748, 37.515822). Измерения проводили на адаксиальной стороне листьев однолетних побегов ветвей нижнего яруса с юго-восточной части деревьев примерно одного возраста. Листья без видимых пожелтений и повреждений отбирались в ранние утренние часы. Исследовали по 5 деревьев вдоль МКАД и из парка. Перед измерениями листья адаптировали к темноте в течение 30 мин. Все измерения проводили не менее чем в пяти повторностях. На рисунках представлены усредненные данные 10 образцов.

Флуоресценцию хлорофилла *a* и кинетику отражения при 820 нм регистрировали с помощью многофункционального анализатора растений M-PEA-2 (Hansatech Instruments Ltd., Великобритания) [17, 21–24]. Возбуждали флуоресценцию красным актиничным светом ($\lambda = 625$ нм) с

Таблица 1. Описание и формулы параметров флуоресценции, полученных из ОЛП-кривых с помощью ЛП-теста [23]

Формулы параметров флуоресценции	Описание параметров флуоресценции
F_0	Минимальная интенсивность флуоресценции, когда все реакционные центры ФС II открыты
$F_M = F_P$	Максимальная (= максимально возможная) флуоресценция во время пика P, когда все реакционные центры ФС II закрыты
$F_V = F_M - F_0$	Максимальная переменная флуоресценция
$V_J = (F_J - F_0)/F_V$	Относительная переменная флуоресценция на J-этапе
$V_I = (F_I - F_J)/F_V$	Относительная переменная флуоресценция на I-этапе
$M_0 = 4(F_{270 \mu s} - F_{20 \mu s})/F_V$	Усредненная величина начального наклона (в ms^{-1}) относительной переменной флуоресценции хлорофилла a, $V = f(t)$
$\Psi_{E_0} = 1 - V_J$	Вероятность транспорта электронов за пределы Q_A^- (при $t = 0$), то есть эффективность, с которой экситон, захваченный RC, движет электрон по цепочке после Q_A^-
$\delta_{R_0} = (1 - V_I)(1 - V_J)$	Вероятность, с которой электрон от переносчиков между двумя фотосистемами восстанавливает крайние акцепторы электрона на акцепторной стороне ФС I
$\Phi_{P_0} (= F_V/F_M) = (F_M - F_0)/F_M$	Максимальный квантовый выход первичной фотохимической реакции (при $t = 0$), который указывает на вероятность захвата энергии поглощенных фотонов RC ФС II.
$\Phi_{E_0} = \Phi_{P_0}\Psi_{E_0}$	Квантовый выход переноса электронов от Q_A^-
$\Phi_{R_0} = (1 - \Phi_{P_0})(1 - V_I)$	Квантовый выход восстановления крайних акцепторов электрона на акцепторной стороне ФС I
$ABS/RC = M_0(1/V_J)(1/\Phi_{P_0})$	Поток энергии, поглощаемой одним активным RC
$TR_0/RC = M_0(1/V_J)$	Поток энергии возбуждения, улавливаемой одним активным RC (приводящий к восстановлению Q_A)
$ET_0/RC = M_0(1/V_J)\Psi_{E_0}$	Поток электронов, переносимых через один активный RC (далее Q_A^-)
$RE_0/RC = M_0(1/V_J)(1 - V_I)$	Поток электронов, переносимых через один активный RC и восстанавливающих крайние акцепторы на акцепторной стороне ФС I
$DI_0/RC = (ABS/RC) - (TR_0/RC)$	Общее количество энергии, рассеиваемой одним RC
$PI_{ABS} = (RC/ABS)(\Phi_{P_0}/(1 - \Phi_{P_0}) \times (\Psi_{E_0}/(1 - \Psi_{E_0}))$	Индекс производительности – показатель функциональной активности ФС II, отнесенный к поглощаемой энергии
$PI_{total} = PI_{ABS}(\delta_{R_0}/(1 - \delta_{R_0}))$	Общий индекс производительности – показатель функциональной активности ФС II, ФС I и цепи переноса электронов между ними

плотностью потока фотосинтетических фотонов (PPFD) 3000 мкмоль фотонов/(m^2 с) в течение 60 с.

Индукционные кривые быстрой флуоресценции (ОЛП-кривые) анализировали с помощью ЛП-теста [23]. Данный тест описывает и обобщает события, связанные с поглощением (ABS), захватом энергии реакционным центром (TR), переносом электронов от Q_A^- к межсистемным электронным акцепторам (ET), восстановлением конечных акцепторов электронов в ФС I (RE) и диссипацией энергии (DI). Все эти события выражаются в виде квантовых выходов (yields) и вероятностей (prob-

abilities), специфических потоков энергии (на реакционный центр, RC) и показателей производительности (PI). В ЛП-тесте используются следующие значения интенсивности флуоресценции: при 20 мкс (F_0), 2 мс (F_J), 30 мс (F_I) а также F_M (максимальная интенсивность флуоресценции). В таблице 1 приведен список используемых параметров флуоресценции ЛП-теста и краткие пояснения.

Индукционные кривые замедленной флуоресценции (ЗФ) регистрировали во время коротких прерываний актиничного света [23]. В нашем исследовании динамика ЗФ отражает изменения

интенсивности свечения в диапазоне 0.1–0.9 мс в интервалах между импульсами актиничного света. Кинетика ЗФ характеризуется быстрой фазой с основным пиком I_1 , вторым пиком (“плечом”) I_2 и промежуточным перегибом D_2 между ними, и медленной фазой, включающей несколько максимумов и минимумов [17].

Кинетика модулированного отражения (MR – modulated reflection) при 820 нм (индукция MR) отражает изменения окислительно-восстановительных состояний P700 и пластоцианина, вклад которых в сигнал составляет примерно 70 и 30%, соответственно. В нашем исследовании, MR сигнал нормировали на первое достоверное значение MR при 0.7 мс [23].

Для анализа и обработки полученных данных использовали пакеты программ OriginPro 2018 и Statistica 10. Средние значения и стандартные отклонения были рассчитаны для каждого показателя.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 представлены индукционные кривые быстрой флуоресценции (ОЛР-кривые) листьев березы и липы из парка (контроль) и растущих вдоль МКАД.

Поскольку нас интересовали изменения на определенных участках ЭТЦ, индукционные кривые были нормированы на переменную флуоресценцию F_V и представлены в виде $V_t = (F_t - F_0)/F_V$, что позволило оценить изменения в отдельных фазах ОЛР-кривых и соответственно выявить изменения на конкретных участках ЭТЦ. У контрольных деревьев, растущих в экологически благоприятных условиях, наблюдали типичные ОЛР-кривые, которые описаны в литературе [9]. Изменения во время фазы О-Ж определяются светоиндуцированным восстановлением Q_A . Начальный уровень О соответствует интенсивности флуоресценции хлорофилла (F_0) при “открытых” РС ФС II, когда все Q_A окислены. Дальнейшая фаза J-I-P отражает последующее накопление восстановленного Q_A^- , обусловленное восстановлением Q_B и пула пластохинонов [9, 15, 16]. У листьев деревьев, растущих вдоль МКАД, форма индукционных кривых несколько отличалась от контрольных деревьев, главным образом, на уровнях J и I (рис. 1). У листьев деревьев вблизи магистрали наблюдали рост амплитуд фаз О-Ж (V_J) и О-И (V_I) по сравнению с контрольными деревьями, обусловленный накоплением Q_B -невосстанавливающих центров в ФС II и снижением электронного транспорта на уровне пластохинонов (рис. 2). При этом у березы выявлен более выраженный рост V_I по сравнению с липой.

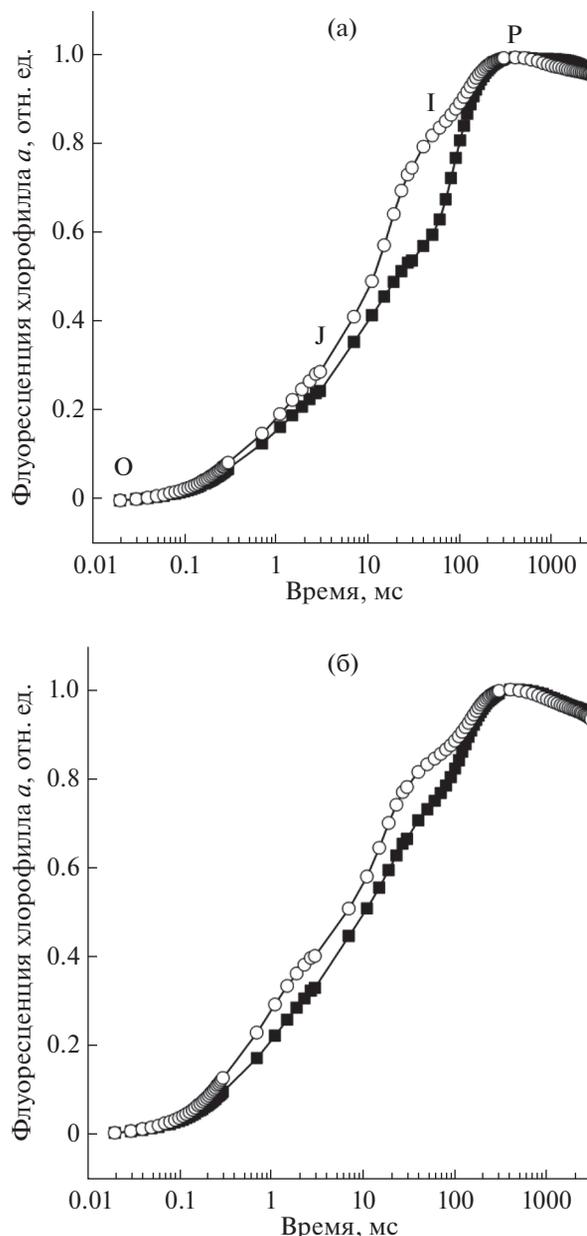


Рис. 1. Индукционные кривые быстрой флуоресценции (ОЛР) листьев деревьев березы *B. verrucosa* (а) и липы *T. cordata* (б) из парка (контроль –■–) и растущих вдоль МКАД (–○–). ОЛР-кривые нормированы на переменную флуоресценцию, $V_t = (F_t - F_0)/F_V$.

Поскольку были выбраны деревья без видимых повреждений листьев, анализ индукционных кривых с помощью ЛР-теста показал, что максимальный квантовый выход первичных фотохимических реакций $F_V/F_M (= \phi_{P_0})$ у листьев деревьев вблизи МКАД находился на достаточно высоком уровне 0.78–0.81 (рис. 2). Однако параметры, связанные с электронным транспортом, у деревьев, растущих вдоль МКАД, отличались от таковых у контрольных деревьев. Так, значимые изменения

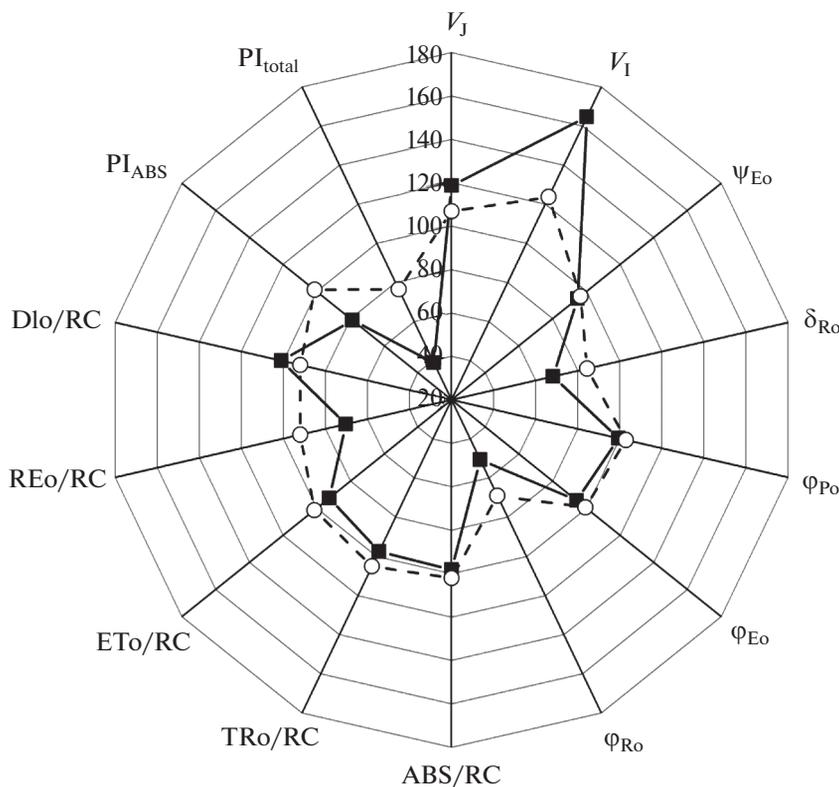


Рис. 2. Параметры JIP-теста, полученные из OJIP-кривых флуоресценции хлорофилла *a* листьев деревьев березы *B. verrucosa* (—■) и липы *T. cordata* (-○-), растущих вдоль МКАД. Данные представлены в процентах от контроля, где 100% – контроль (деревья из парка).

были выявлены в снижении эффективности электронного транспорта между двумя фотосистемами (δ_{Ro}) у деревьев, произрастающих вблизи МКАД. Кроме того, у них обнаружено существенное снижение квантового выхода восстановления крайних акцепторов на акцепторной стороне ФС I (ϕ_{Ro}). Тогда как скорость линейного электронного транспорта на акцепторной стороне ФС II между Q_A и Q_B практически не изменялась у деревьев возле МКАД. Параметры, характеризующие вероятность транспорта электронов за пределы Q_A^- (ψ_{Eo}), и квантовый выход переноса электронов от Q_A^- (ϕ_{Eo}) у листьев деревьев близ магистрали не отличались от данных параметров контрольных деревьев.

Поглощение потока энергии (ABS/RC) и последующий захват энергии (TRo/RC) одним активным RC в ФС II у деревьев березы и липы близ МКАД и из экологически благоприятного района были практически одинаковыми. Из этого следует, что загрязнения близ магистралей оказывают малое воздействие на процессы поглощения и передачи энергии возбуждения со светособирающего комплекса на RC. Наряду с отсутствием изменений в параметрах ABS/RC и TRo/RC у данных деревьев не выявлено изменений в отношении

параметра ETo/RC, характеризующего поток электронов, переносимый через один активный RC (далее Q_A^-). Кроме того, у них не наблюдалось существенного увеличения рассеивания энергии (Dlo/RC). Однако у берез, растущих вдоль МКАД, обнаружено уменьшение потока электронов, восстанавливающих крайние акцепторы в ФС I (REo/RC). У липы вблизи МКАД подобных изменений не наблюдалось.

Индексы продуктивности работы фотосинтетического аппарата – PI_{ABS} и PI_{total} представляют собой произведения частных потенциалов на последовательных этапах преобразования энергии [9]. Уменьшение PI_{ABS} обнаружено у листьев берез, растущих вдоль МКАД, по сравнению с контрольными деревьями, что свидетельствует о снижении функционального состояния ФС II при воздействии загрязнений на дорожной магистрали. Ранее было показано, что часто при неблагоприятных воздействиях максимальный квантовый выход фотохимии ФС II (F_V/F_M) не изменяется, в то время как функциональная активность ФС II, выраженная через PI_{ABS} , снижается [25]. В отличие от параметра PI_{ABS} , который снижался только у березы, растущей вдоль магистрали, изменения в параметре PI_{total} выявлены как у листьев березы, так и у липы

вблизи МКАД. Параметр PI_{total} представляет собой произведение двух параметров PI_{ABS} и δ_{Ro} . Снижение параметра PI_{total} листьев обусловлено нарушением потока электронов между фотосистемами (δ_{Ro}).

Регистрация кинетики модулированного отражения при 820 нм (MR) позволяет следить за реакциями переносчиков пластоцианина и главным образом P700 (RC ФС I). На рис. 3 представлены кинетики MR листьев березы (а) и липы (б) из парка (контроль) и, растущих вдоль МКАД. Кинетика MR характеризуется двумя фазами. Первая фаза представляет собой начальное светоиндуцированное окисление P700, которое сопровождается снижением сигнала MR за счет оттока электронов от ФС I. В момент времени $t \approx 20\text{--}30$ мс в кинетике MR достигается переходное устойчивое состояние, когда скорость окисления P700 равна скорости восстановления P700⁺. Вторая фаза характеризует последующее увеличение сигнала MR, которое отражает восстановление P700⁺ за счет перехода электронов от ФС II. Как видно из рисунка 3а, у листьев березы, растущих вдоль МКАД, наблюдали значительное уменьшение сигнала MR при 30 мс по сравнению с деревьями из парка, обусловленное снижением оттока электронов от ФС I. Кроме того, обнаружено небольшое уменьшение скорости восстановления P700⁺ у листьев березы. В отличие от берез, растущих вдоль МКАД, у лип из той же зоны выявлено, что P700 способен к процессам окисления при включении света, однако, у них наблюдается снижение скорости восстановления P700⁺ вследствие нарушения электронного транспорта от ФС II, что заметно по уменьшению интенсивности сигнала MR при 200 мс (рис. 3б). Полученные данные согласуются с данными анализа индукционных кривых быстрой флуоресценции.

Регистрация кинетики ЗФ является одним из методов, который позволяет следить за энергизацией тилакоидных мембран [7, 17, 23]. ЗФ тесно связана с фотохимическими реакциями, протекающими в RC ФС II. Во временном интервале от нескольких микросекунд до миллисекунд кинетика затухания ЗФ связана с процессами рекомбинации зарядов между восстановленным первичным акцептором Q_A^- и окисленным первичным донором P680⁺ в ФС II. В типичной индукционной кривой ЗФ зеленого листа при включении возбуждающего света различают несколько фазовых переходов [7]. Индукционную кривую ЗФ можно описать с помощью пиков I₁–I₄. У деревьев, растущих в парке, максимум I₁ наблюдался через 10 мс и “плечо” I₂ примерно через 100 мс после начала освещения. Появление данных пиков связано с формированием мембранного (электрического) потенциала на мембране за счет разделения зарядов и переноса электронов на акцепторной сто-

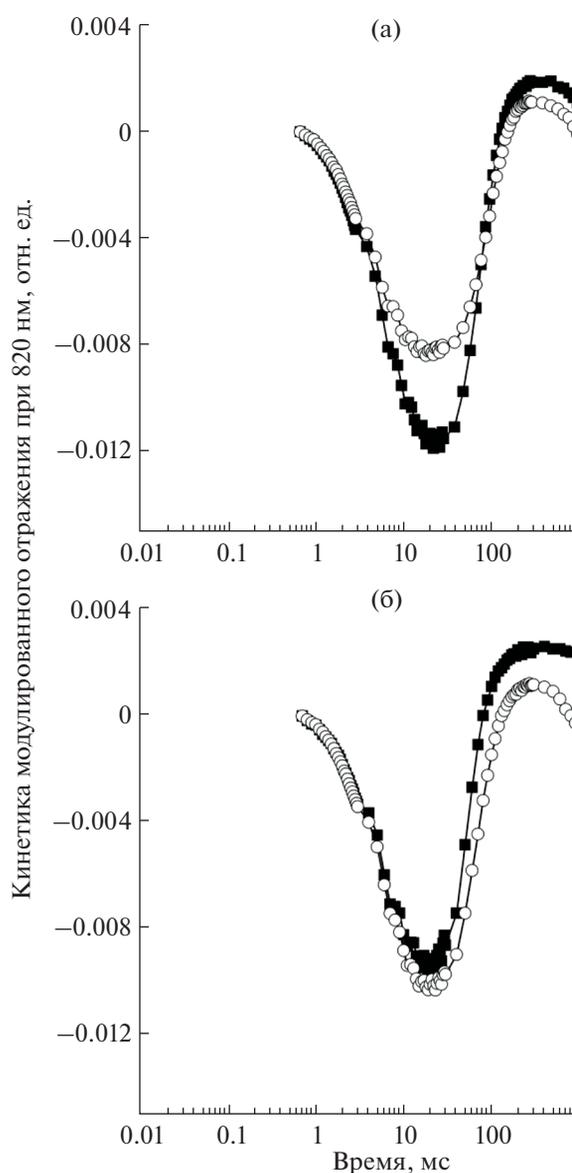


Рис. 3. Кинетика модулированного отражения (MR) при 820 нм листьев деревьев березы *B. verrucosa* (а) и липы *T. cordata* (б) из парка (контроль —■—) и растущих вдоль МКАД (—○—). Значения MR нормированы на 0.7 мс.

роне ФС II и за ее пределами [7]. Провал D₂, разделяющий быструю и медленную фазы, наблюдался примерно через 250 мс. В медленной фазе обнаружен одиночный пик I₄ примерно через 2 с, связанный с формированием трансмембранного градиента протонов (ΔpH) на мембране тилакоидов [7]. У деревьев липы, растущих вдоль МКАД, обнаружены изменения в форме индукционных кривых ЗФ (рис. 4). Так, наблюдали снижение интенсивности и сдвиг пика I₁ во времени у деревьев близ МКАД по сравнению с деревьями, растущими в парке. Кроме того, у данных деревьев

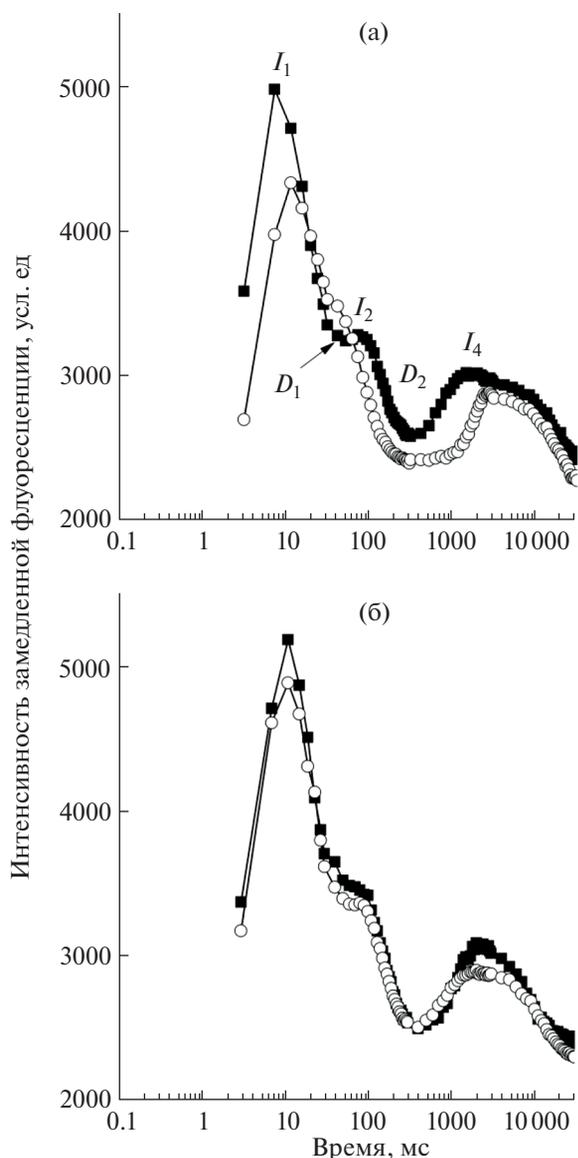


Рис. 4. Кинетика светоиндуцированной замедленной флуоресценции (ЗФ) хлорофилла *a* листьев деревьев березы *B. verrucosa* (а) и липы *T. cordata* (б) из парка (контроль —■—) и растущих вдоль МКАД (—○—). I_1 , I_2 , и I_4 — экстремумы кинетики ЗФ; D_1 и D_2 — минимумы кинетики ЗФ.

отмечалось уменьшение интенсивности пика I_4 и небольшой сдвиг пика I_2 . Эти изменения в индукционных кривых ЗФ были менее выражены у деревьев липы, растущих вдоль МКАД, по сравнению с березой.

Из литературных данных известно, что избыточное и продолжительное освещение приводит к временному отключению работы фотосинтеза на уровне ФС II, известное как фотоингибирование [26]. Снижение фотосинтетической активности в дневные часы зависит от интенсивности света и изменения физиологического состояния растений.

Это связано с включением защитных процессов диссипации избыточной световой энергии в тепло и с распадом D_1 -белка ФС II [27, 28]. Концентрация активных центров ФС II в клетках зависит от соотношения скоростей ее фотоокислительной деструкции и репарации, которые могут быть определены по снижению величины параметра F_V/F_M на интенсивном свете и его последующего восстановления в темноте или на очень слабом свете [28, 29]. На рис. 5 представлено изменение параметра F_V/F_M листьев березы (а) и липы (б) из парка (контроль) и, растущих вдоль МКАД, при повышенной освещенности 2500 мкмоль фотонов/($m^2 \cdot c$) в течение 40 мин и последующей темновой экспозиции. У деревьев свет высокой интенсивности приводил к уменьшению величины F_V/F_M . При этом эффект фотоингибирования в большей степени проявлялся у листьев липы, чем у светолюбивой березы. Так, значения параметра F_V/F_M у контрольной березы снижались на свету с 0.81 до 0.73, а у липы — с 0.78 до 0.68. Кроме того, у листьев берез, растущих вдоль МКАД, F_V/F_M снижались с 0.81 до 0.68, а у лип из той же зоны F_V/F_M — с 0.78 до 0.59. После освещения листья помещали в темноту и регистрировали восстановление F_V/F_M через 1, 2 и 4 ч. Как видно из рисунка 5, восстановление F_V/F_M у листьев деревьев из парка происходило быстрее, чем у деревьев близ МКАД. Полное восстановление F_V/F_M у деревьев произошло за 4 ч, тогда как деревья, растущие вдоль МКАД, не полностью восстановили свою фотосинтетическую активность листьев после фотоокислительного стресса.

ОБСУЖДЕНИЕ

Городские деревья играют важную роль в очищении воздуха от загрязнений. В крупных городах наблюдается повышенное загрязнение воздуха и почв, а деревья, растущие на улицах, особенно подвержены загрязнению в результате движения транспортных средств. На автомобильных магистралях одними из загрязнителей воздуха выступают тяжелые металлы. Тяжелые металлы в растениях вызывают накопление АФК, снижают антиоксидантную активность, индуцируют ПОЛ, ингибируют биосинтез пигментов, фотосинтетический транспорт электронов, активность цикла Кальвина-Бенсона, воздействуют на ультраструктуру хлоропластов [19, 20].

В настоящее время достигнуты определенные успехи в изучении воздействия тяжелых металлов на фотосинтетические реакции растений с помощью флуоресцентных методов [21, 22, 30, 31]. Полученные данные в контролируемых условиях служат основой для интерпретации реакций растений на эти загрязнения, наблюдаемых в окружающей среде.

Липы и березы являются одними из популярных деревьев, которые используют в городском озеленении. Липа теневынослива, имеет компактную крону, нетребовательна к почвенным условиям. Береза светолюбива, также нетребовательна к почвам, обладает высокой фитонцидной активностью, но в то же время негазоустойчива.

Ранее мы проводили исследования состояния городских деревьев липы и березы в районе Дмитровского шоссе г. Москвы с помощью регистрации индукционных кинетик флуоресценции хлорофилла [32]. Было показано, что у деревьев близ автомобильных магистралей наблюдалось уменьшение скорости фотосинтетического электронного транспорта (Φ_{E0}) и максимального квантового выхода ФС II (F_V/F_M). Изменения в функционировании ФС II у городских деревьев отмечались и в других работах [18, 2].

В данной работе мы изучили состояние городских деревьев березы и липы, растущих вдоль МКАД и в 150 м от автодороги в Ясеневском лесопарке, с помощью многофункционального анализатора растений M-PEA2, который позволяет одновременно следить за электрон-транспортными процессами, протекающими в фотосистемах и между ними. Применение данного подхода позволило оценить изменения в отдельных реакциях электронного транспорта у листьев деревьев, произрастающих в различных городских условиях. Нами были исследованы фотосинтетические реакции листьев деревьев без видимых повреждений, что проявлялось в отсутствии изменений в параметре $F_V/F_M (= \Phi_{P0})$.

У деревьев березы и липы, растущих вдоль МКАД, фотосинтетическая активность, определенная по параметру F_V/F_M , находилась на достаточно высоком уровне. Значения параметра F_V/F_M составляли 0.78–0.81. Высокие значения F_V/F_M свидетельствуют о способности реакционных центров ФС II к фотохимическому преобразованию поглощенной энергии. Полученные данные согласуются с данными по воздействию таких тяжелых металлов как хром и кадмий, которые при низких концентрациях и краткосрочном воздействии не оказывают влияния на первичные фотохимические реакции в ФС II растений гороха [21, 22]. Электронный транспорт на акцепторной стороне ФС II между Q_A и Q_B (Ψ_{E0} и Φ_{E0}) значимо не изменялся у деревьев возле МКАД, что свидетельствует об отсутствии изменений в ФС II у листьев деревьев вблизи этой транспортной магистрали.

Несмотря на отсутствие изменений в активности ФС II, перенос электронов из пула PQ на терминальные акцепторы электронов ФС I (δ_{R0} и Φ_{R0}) был снижен у деревьев вблизи МКАД. Полученные результаты свидетельствуют об ухудшении электронного транспорта за пределами PQ пула, пред-

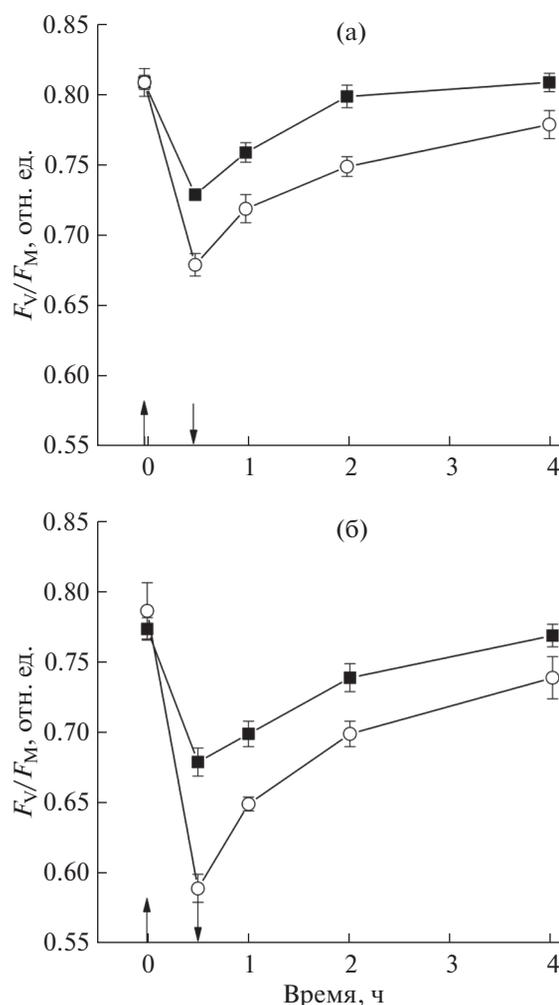


Рис. 5. Изменение параметра F_V/F_M листьев деревьев березы *B. verrucosa* (а) и липы *T. cordata* (б) из парка (контроль —■—) и растущих вдоль МКАД (—○—), при повышенной освещенности 2500 мкмоль фотонов/(м² с) в течение 40 мин и последующей темновой экспозиции. Стрелками вверх и вниз показаны моменты включения (↑) и выключения (↓) света, соответственно.

положительно на уровне цитохромного b_6f комплекса. По-видимому, данный участок ЭТЦ является наиболее чувствительным к внешним воздействиям, что согласуется с нашими данными, полученными на листьях гороха при воздействии хрома и кадмия [21, 22]. Известно, что окисление пластохинола цитохромным b_6f комплексом является основным звеном в цепи переноса электронов в хлоропластах, которое определяет скорость переноса электронов между ФС II и ФС I. Основным процессом, определяющим скорость окисления PQH_2 цитохромным b_6f комплексом, является “химическая” стадия реакции, связанная с переносом электрона и протона от PQH_2 к соответствующим акцепторам [33]. Bus-sotti с соавт. [34] предполагают, что в крупномас-

штабных исследованиях общая фотохимическая эффективность может быть представлена двумя независимыми параметрами, F_V/F_M и I-P фазой, которые представляют эффективность ФС II и ФС I, соответственно. Ранее было показано, что при воздействии озона (O_3) на характеристики флуоресценции хлорофилла F_V/F_M совершенно нечувствителен, по крайней мере, на первых фазах обработки озоном, тогда как наиболее изменчивыми оказались амплитуда фазы I-P и параметр RC/CS_0 , характеризующий количество реакционных центров [35]. В нашем исследовании нарушение электронного транспорта между фотосистемами приводило к снижению общей функциональной активности (PI_{total}).

Измерение кинетической кривой MR при 820 нм и ОЖР-кривых с помощью М-РЕА-2 позволило одновременно следить за реакциями, протекающими в фотосистемах. Начальное светоиндуцированное окисление P700 сопровождалось снижением сигнала MR за счет оттока электронов от ФС I, в то время как в кинетике ОЖР приходило последовательное восстановление Q_A . При этом увеличение сигнала MR и достижение максимального уровня флуоресценции в ОЖР происходило одновременно при 200–300 мс. Параллельное накопление восстановленных форм P700 и Q_A отражает восстановление переносчиков на всем участке ЭТЦ между фотосистемами в связи с отсутствием оттока электронов из акцепторной части ФС I в условиях, когда ферредоксин-НАДФ-редуктаза инактивирована вследствие темновой инкубации [23].

Снижение параметров δ_{Ro} и ϕ_{Ro} согласовалось с уменьшением амплитуды MR, характеризующей снижение скорости восстановления P700⁺ у деревьев, растущих вдоль МКАД. Полученные данные свидетельствуют о снижении электронного транспорта от ФС II к ФС I. У берез близ МКАД также было выявлено уменьшение скорости окисления P700, тогда как у лип около МКАД этот процесс был мало изменен, о чем свидетельствует схожий характер амплитуд MR деревьев лип из парка и вдоль магистралей. Данные по MR на березах вдоль МКАД согласуются с данными, полученными при воздействии кадмия на реакции P700 растений гороха, у которых выявлено, что при долгосрочном воздействии металла электронный транспорт через ФС I нарушается [22]. Это также свидетельствует о большей чувствительности берез к загрязнениям.

У растений березы вблизи МКАД также отмечалось небольшое снижение интенсивности замедленной флуоресценции при 20–50 мс (I_1) и 1 с (I_4), которые связаны с формированием электрохимического градиента протонов на тилакоидной мембране [7, 17, 23].

Известно, что изменение параметров флуоресценции хлорофилла растений имеет типичный суточный характер [36], при котором в утренние и вечерние часы в период низкой солнечной активности наблюдаются высокие значения фотосинтетической активности (F_V/F_M). В полуденные часы высокая интенсивность солнечного излучения приводит к фотоингибированию фотосинтетического аппарата с депрессией F_V/F_M [37].

Ранее во многих работах отмечалось, что повышенная освещенность значительно усиливает неблагоприятное воздействие многих факторов, в том числе и загрязнений [27, 38], которые связаны с изменениями на уровне ФС II и снижением F_V/F_M . В наших опытах по фотоингибированию после выключения интенсивного освещения листья березы и липы из парка показывали обратимое восстановление активности по F_V/F_M . В то же время у листьев деревьев вблизи МКАД наблюдалось неполное восстановление после освещения, что свидетельствует о необратимых повреждениях после фотостресса, вызванного светом высокой интенсивности. Степень необратимости у листьев березы была выше, чем у листьев липы. Очевидно, неблагоприятные условия произрастания вблизи МКАД оказывают негативное воздействие на белок-синтетические процессы в листе, что выявляется в появлении необратимых повреждений при фотоокислительном стрессе.

Среди изученных деревьев береза оказалась в большей степени подверженной воздействию загрязнителей на автомобильных магистралях по сравнению с липой. Это проявилось в значительном снижении параметров флуоресценции, связанных с ФС I и межсистемным электронным транспортом.

Таким образом, применение одновременной регистрации кинетик быстрой и замедленной флуоресценции, и модулированного отражения при 820 нм позволило изучить состояние первичных фотохимических реакций фотосинтеза деревьев в различных городских условиях. Использование параметров быстрой и замедленной флуоресценции, в особенности при световом стрессе может быть рекомендовано для оценки функциональной активности фотосинтетического аппарата растений и раннего обнаружения изменений в условиях антропогенной нагрузки, когда экологическая обстановка не является критической. Среди параметров флуоресценции в качестве индикаторов состояния деревьев в городской среде предложены общий индекс производительности (PI_{total}) и квантовый выход восстановления акцепторов электрона на акцепторной стороне ФС I (ϕ_{Ro}).

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-11-00009.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-

либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Венедиктов П.С., Казимирко Ю.В., Кренделева Т.Е., Кукарских Г.П., Макарова В.В., Погосян С.И., Яковлева О.В., Рубин А.Б. Изучение физиологического состояния древесных растений по характеристикам флуоресценции в коре однолетних побегов деревьев // Экология. 2000. № 5. С. 338.
2. Волгушева А.А., Яковлева О.В., Кукарских Г.П., Ризниченко Г.Ю., Кренделева Т.Е. Использование показателя P1 для оценки физиологического состояния деревьев в городских экосистемах // Биофизика. 2011. Т. 56. С. 105.
3. Fusaro L., Salvatori E., Winkler A., Frezzini M.A., De Santis E., Sagnotti L., Canepari S., Manes F. Urban trees for biomonitoring atmospheric particulate matter: an integrated approach combining plant functional traits, magnetic and chemical properties // Ecol. Indic. 2021. V. 126. P. 107707. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107707>
4. Swoczyna T., Kalaji H.M., Bussotti F., Mojski J., Pollastrini M. Environmental stress - what can we learn from chlorophyll a fluorescence analysis in woody plants? A review // Front. Plant Sci. 2022. V. 13. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1048582>
5. Huaranca Reyes T., Scartazza A., Bretzel F., Di Baccio D., Guglielminetti L., Pini R., Calfapietra C. Urban conditions affect soil characteristics and physiological performance of three evergreen woody species // Plant Physiol. Biochem. 2022. V. 171. P. 169. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.12.030>
6. Маторин Д.Н., Рубин А.Б. Флуоресценция хлорофилла высших растений и водорослей // Москва—Ижевск: Институт компьютерных исследований. 2012. 256 с.
7. Гольцев В.Н., Каладжи М.Х., Кузманова М.А., Аллахвердиев С.И. Переменная и замедленная флуоресценция хлорофилла а – теоретические основы и практическое приложение в исследовании растений // Москва—Ижевск: Институт компьютерных исследований. 2014. 220 с.
8. Schreiber U. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an Overview // Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis / Eds. G. Papageorgiou and Govindjee. Springer. 2004. P. 279. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-3218-9_11
9. Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient // Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration / Eds. G. Papageorgiou and Govindjee. Springer. 2004. V. 19. P. 321. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-3218-9_12
10. Bąba W., Kompała-Bąba A., Zabochnicka-Świątek M., Luźniak J., Hanczaruk R., Adamski A., Kalaji H.M. Discovering trends in photosynthesis using modern analytical tools: more than 100 reasons to use chlorophyll fluorescence // Photosynthetica. 2019. V. 57. P. 668. <https://doi.org/10.32615/ps.2019.069>
11. Clark A.J., Landolt W., Bucher J.B., Strasser R.J. Beech (*Fagus sylvatica*) response to ozone exposure assessed with a chlorophyll a fluorescence performance index // Environ. Pollut. 2000. V. 109. P. 501. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00053-1](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00053-1)
12. Adams W.W., Demming-Adams B. Chlorophyll fluorescence as a tool to monitor plant response to the environment // Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration / Eds. G. Papageorgiou and Govindjee. Springer. 2004. V. 19. P. 583. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-3218-9_22
13. Cavender-Bares J., Bazzaz F.A. From leaves to ecosystems: using chlorophyll fluorescence to access photosynthesis and plant function in ecological studies // Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration / Eds. G. Papageorgiou and Govindjee. Springer. 2004. V. 19. P. 737. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_29
14. Murchie E.H., Lawson T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications // J. Exp. Bot. 2013. V. 64. Iss. 13. P. 3983. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert08>
15. Lazár D. Modelling of light-induced chlorophyll a fluorescence rise (O-J-I-P transient) and changes in 820 nm – transmittance signal of photosynthesis // Photosynthetica. 2009. V. 47. P. 483. <https://doi.org/10.1007/s11099-009-0074-8>
16. Schansker G., Tóth S.Z., Strasser R.J. Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP // BBA. 2005. V. 1706. P. 250. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.11.006>
17. Oukarroum A., Goltsev V., Strasser R.J. Temperature effects on pea plants probed by simultaneous measurements of the kinetics of prompt fluorescence, delayed fluorescence and modulated 820 nm reflection // PLoS ONE. 2013. V. 8. P. e59433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059433>
18. Hermans C., Smeyers M., Rodrigues R.M., Eyletter M., Strasser R., Dehaye J.P. Quality assessment of urban's trees: a comparative study of physiological characterization, airborne imaging and on site fluorescence monitoring by the OJIP test // J. Plant Physiol. 2003. V. 160. P. 81. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00917>
19. Prasad M.N.V., Strzałka K. Impact of heavy metals on photosynthesis // Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems / Eds. M.N.V. Prasad and J. Hagemeyer. Springer. 1999. P. 117.
20. Souri Z., Cardoso A.A., da-Silva C.J., de Oliveira L.M., Dari B., Sihi D., Karimi N. Heavy metals and photosynthesis: recent developments // Photosynthesis, productivity and environmental stress / Eds. P. Ahmad et al. 2019. P. 107. <https://doi.org/10.1002/9781119501800.ch7>
21. Todorenko D., Timofeev N., Kovalenko I.B., Kukarskikh G.P., Matorin D.N., Antal T.K. Chromium effects on photosynthetic electron transport in pea (*Pisum sativum* L.) //

- Planta. 2020. V. 251. P. 11.
<https://doi.org/10.1007/s00425-019-03304-1>
22. *Todorenko D., Volgusheva A., Timofeev N., Kovalenko I., Matorin D., Antal T.* Multiple *in vivo* effects of cadmium on photosynthetic electron transport in pea plants // *Photochem. Photobiol.* 2021. V. 97. P. 1516.
<https://doi.org/10.1111/php.13469>
 23. *Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Qiang S., Goltsev V.* 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.* 2010. V. 1797. P. 1313.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.03.008>
 24. *Shen J., Li X., Zhu X., Ding Z., Huang X., Chen X., Jin S.* Molecular and photosynthetic performance in the yellow leaf mutant of *Torreya grandis* according to transcriptome sequencing, chlorophyll a fluorescence, and modulated 820 nm reflection // *Cells.* 2022. V. 11. P. 431.
<https://doi.org/10.3390/cells11030431>
 25. *Zivcak M., Olsovska K., Slamka P., Galambošová J., Rataj V., Shao H.B., Brestič M.* Application of chlorophyll fluorescence performance indices to assess the wheat photosynthetic functions influenced by nitrogen deficiency // *Plant Soil Environ.* 2014. V. 60 P. 210.
<https://doi.org/10.17221/73/2014-PSE>
 26. *Murata N., Takabashi S., Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I.* Photoinhibition of photosystem II under environmental stress // *BBA.* 2007. V. 1767. P. 414.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.11.019>
 27. *Aro E.-M., Virgin I., Andersson B.* Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover // *BBA.* 1993. V. 1143. P. 113.
[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(93\)90134-2](https://doi.org/10.1016/0005-2728(93)90134-2)
 28. *Chow W.S., Aro E.-M.* Photoinactivation and mechanisms of recovery // *Photosystem II: the light-driven water: plastoquinone oxidoreductase* / Eds. T. Wydrzynski and K. Satoh. Springer. 2005. P. 627.
 29. *Vavilin D.V., Polynov V.A., Matorin D.N., Venediktov P.S.* The sublethal concentrations of copper stimulate photosystem II photoinhibition in *Chlorella pyrenoidosa* // *J. Plant Physiol.* 1995. V. 146. P. 609.
[https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81922-X](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81922-X)
 30. *Kalaji H.M., Jajoo A., Oukarroum A., Brestic M., Zivcak M., Samborska I.A., Cetner M.D., Łukasik I., Goltsev V., Laldle R.J.* Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions // *Acta Physiol. Plant.* 2016. V. 38. P. 102.
<https://doi.org/10.1007/s11738-016-2113-y>
 31. *Paunov M., Koleva L., Vassilev A., Vangronsveld J., Goltsev V.* Effects of different metals on photosynthesis: cadmium and zinc. Affect chlorophyll fluorescence in Durum wheat // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. P. 787.
<https://doi.org/10.3390/ijms19030787>
 32. *Орехов Д.И., Яковлева О.В., Горячев С.Н., Протопопов Ф.Ф., Алексеев А.А.* Использование параметров индукции флуоресценции хлорофилла *a* для оценки состояния растений в условиях антропогенной нагрузки // *Биофизика.* 2015. V. 60. № 2. С. 330.
 33. *Устынюк Л.Ю., Тихонов А.Н.* Окисление пластохинола – лимитирующая стадия в цепи переноса электронов в хлоропластах // *Биохимия.* 2022. Т. 87. № 10. С. 1372.
<https://doi.org/10.31857/S0320972522100049>
 34. *Bussotti F., Gerosa G., Digrado A., Pollastrini M.* Selection of chlorophyll fluorescence parameters as indicators of photosynthetic efficiency in large scale plant ecological studies // *Ecol. Indic.* 2020. V. 108. P. 105686.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105686>
 35. *Bussotti F., Desotgiu R., Cascio C., Pollastrini M., Gravano E., Gerosa G., Marzuoli R., Nali C., Lorenzini G., Salvatori E., Manes F., Schaub M., Strasser R.J.* Ozone stress in woody plants assessed with chlorophyll a fluorescence. A critical reassessment of existing data // *Environ. Exp. Bot.* 2011. V. 73. P. 19.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.10.022>
 36. *Zhang S., Gao R.* Diurnal changes of gas exchange, chlorophyll fluorescence, and stomatal aperture of hybrid poplar clones subjected to midday light stress // *Photosynthetica.* 2000. V. 37. P. 559.
<https://doi.org/10.1023/A:1007119524389>
 37. *Guo W.D., Guo Y.P., Liu J.R., Mattson N.* Midday depression of photosynthesis is related with carboxylation efficiency decrease and D1 degradation in bayberry (*Myrica rubra*) plants // *Sci. Hortic.* 2009. V. 123. P. 188.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.07.014>
 38. *Pätsikkä E., Aro E.-M., Tyystjärvi E.* Increase in the quantum yield of photoinhibition contributes to copper toxicity *in vivo* // *Plant Physiol.* 1998. V. 117. P. 619.