

УДК 577.3:581.1

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕАКТИВНОСТИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ

© 2019 г. Т. В. Нестеренко¹, *, В. Н. Шихов¹, А. А. Тихомиров¹

¹Институт биофизики СО РАН,
660036 Красноярск, Академгородок, 50/50, Россия

*E-mail: tv-nesterenko@mail.ru

Поступила в редакцию 08.05.2018 г.

После доработки 20.08.2018 г.

Принята к публикации 01.11.2018 г.

В настоящее время наиболее перспективным направлением изучения, прогнозирования и повышения устойчивости организмов к экстремальным воздействиям считается оценка исходного функционального состояния регуляторных систем организма. Для решения проблем устойчивости фотосинтетического аппарата (ФСА) к экстремальным воздействиям на уровне такой сложной функциональной системы как лист растения необходимо оценивать интегральные реакции ФСА листа в целом. При этом более простые и универсальные показатели могут иметь определенные преимущества. Флуоресценция хлорофилла является одним из основных быстро регистрируемых показателей фотосинтетической активности растений. Один из подходов может заключаться в использовании для оперативной интегральной оценки активности ФСА параметров, введенных для кривых медленной стадии индукции флуоресценции хлорофилла (ИФХ). Особый интерес вызывают временные характеристики ИФХ. Наиболее простой показатель $T_{0,5}$ (время полуспада интенсивности флуоресценции хлорофилла в течение медленной фазы ИФХ) представляет собой интегральную характеристику скорости активации ряда фотоассимиляционных и фотозащитных процессов в листе. На основании ранее проведенных исследований и литературных данных в работе анализируется поведение параметра $T_{0,5}$ в сравнении с другими характеристиками ИФХ (q_N – коэффициентом нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла, ETR – потоком электронов через фотосистемы, Φ_{PSII} – квантовым выходом фотохимической реакции в ФС II и отношением F_p/F_T) в разных ситуациях. Рассмотрено влияние старения листьев растений, изменения интенсивности возбуждающего ИФХ света, слабого обезвоживания растений и восстановления их водного дефицита. Наблюдаемые в экспериментах особенности в поведении $T_{0,5}$ и сравнение его с другими показателями ИФХ дают основания предложить применение $T_{0,5}$ для косвенной оценки изменения активности ФСА в ситуациях, когда необходим оперативный интегральный контроль за состоянием ФСА. Для установления количественных закономерностей между активностью ФСА и флуоресцентным параметром $T_{0,5}$ в конкретных стрессовых условиях необходимы дальнейшие исследования.

DOI: 10.1134/S0044459619030060

Для оперативного мониторинга экосистем в условиях резких климатических изменений и антропогенных воздействий оценка состояния фитоценозов имеет особое значение из-за высокой чувствительности фотосинтеза растений к изменениям окружающей среды. Показано, что наиболее чувствительными к действию стрессовых факторов среды физиологическими процессами у растений являются первичные процессы фотосинтеза (Lichtenthaler, Rinderle, 1988; Сааков, 2000; Кочубей и др., 2006). Все стрессовые факторы, действующие на какую-либо часть растения, прямо или косвенно влияют на активность фотосинтетического аппарата (ФСА) на уровне листа (Мокроносов, 1981). Одной из наиболее сложных

задач при исследовании устойчивости растительных объектов является определение “нормы” реагирования биосистемы на действующий фактор (Булгаков, 2002; Нестеренко и др., 2007). В этом отношении большие возможности открывает применение в экологии метода индукции флуоресценции хлорофилла (ИФХ), позволяющего более оперативно оценивать состояние фотосинтетического аппарата растений и его реакции на неблагоприятные воздействия разной природы (Lichtenthaler, Rinderle, 1988; Nesterenko et al., 2006; Шихов и др., 2011; Ashraf, Harris, 2013).

Понятие реактивности фотосинтетического аппарата в настоящее время имеет качественный характер, как и многие биологические понятия.

Однако имеются методические подходы для характеристики реактивных свойств отдельных функциональных систем. Реактивность может характеризоваться при этом не одним, а несколькими параметрами, в том числе и временными. Широко применяемый в мировой практике метод ИФХ уже давно зарекомендовал себя как объективный и оперативный способ определения физиологического состояния фотосинтетического аппарата растений в нормальных и стрессовых условиях (Гольцев и др., 2016; Kalaji et al., 2017). Явление индукции флуоресценции хлорофилла или эффект Каутского (Govindjee, 1995) косвенно связано со всеми этапами световой фазы процесса фотосинтеза: фотолизом воды, переносом электронов, генерацией градиента рН на мембранах тилакоидов и синтезом АТФ (Kalajet et al., 2014; Гольцев и др., 2016; Lyu, Lazár, 2017a, b). Однако, несмотря на большие потенциальные возможности метода ИФХ, участие его в оценке состояния растений по шкале “норма–патология” в стрессовых условиях пока еще остается недостаточно активным из-за сложности реакции исследуемых объектов (Тарчевский и др., 1975; Lichtenthaler, Rinderle, 1988; Бухов, 2004; Лысенко и др., 2014) и ряда технических трудностей при регистрации ИФХ (Nesterenko et al., 2006; Алексеев и др., 2012; Nesterenko et al., 2015; Шихов и др., 2016a).

В статье мы попытались отразить сложность ситуации с точной оценкой реактивности ФСА и обосновать возможность использования простых параметров медленной стадии индукции флуоресценции хлорофилла (ИФХ), ранее уже предложенных, но, к сожалению, пока мало используемых в мониторинге состояния ФСА в стрессовых условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для количественной оценки показателей ИФХ F_p/F_T и $T_{0.5}$ листьев растений на старение и изменения интенсивности света анализировали экспериментальные данные, полученные с использованием растений огурца, редиса, пшеницы. Объектами исследования были высечки разновозрастных листьев пшеницы линии 232 селекции Лисовского (лист 5-го яруса снизу); редиса сорта “Вировский белый” (3-й лист), огурца сорта “Московский тепличный” (лист 3-го яруса). Растения выращивали в условиях светокультуры в вегетационных камерах методом гидропонии на керамзите при уровне облученности 100 Вт/м² фотосинтетически активной радиации (ФАР) (Tikhomirov, Sid'ko, 1982). Для растений пшеницы

и редиса использовали непрерывное облучение, для огурца – фотопериод: 10 ч темноты, 14 ч света. Температура воздуха поддерживалась при $20 \pm 1^\circ\text{C}$, содержание CO_2 – в пределах 0.3–0.8%; относительная влажность воздуха – на уровне 70–80%. Эксперименты были проведены в 3-кратной повторности. Регистрацию кривых ИФХ проводили на однолучевой установке (Nesterenko et al., 2012). Время регистрации кривой ИФХ составляло 3–5 мин, время темновой адаптации растений – 30 мин.

Для оценки степени изменений значений параметров ИФХ $T_{0.5}$, ETR и Φ_{PSII} листьев при водном дефиците и репарации анализировали данные, полученные на растениях листовой капусты сорта Бансэй Маруба (Шихов и др., 2016b). Растения выращивали в условиях светокультуры на вегетационной установке закрытого типа. Для освещения использовали комбинацию ламп ДРФ-1000 и ДРЛ-1000. Освещенность в камере составляла порядка 100 Вт/м² ФАР. Температура воздуха поддерживалась на уровне $24 \pm 1^\circ\text{C}$, влажность воздуха – около 70%. Растения выращивали в двух отдельных вегетационных сосудах. Полив осуществлялся автоматически один раз в сутки. Концентрация CO_2 была атмосферная. Флуоресцентные измерения проводили на интактных листьях с помощью флуориметра РАМ-2100 производства фирмы Walz (Германия). Темновая адаптация перед измерениями составляла 30 мин (Шихов и др., 2016a). Интенсивность действующего белого света от внутреннего галогенного источника составляла около 200 Вт/м² ФАР. Измерения флуоресценции проводили ежедневно в четырех повторностях для каждого исследуемого варианта на зрелых листьях, находящихся в верхней части растительного ценоза. По достижении растениями возраста 21 сут один из вегетационных сосудов был отключен от системы полива с целью создания стрессовых условий водного дефицита. Стрессовые условия длились до полной потери тургора листьев и контролировались при помощи системы видеомониторинга. На 4-е сутки полив был возобновлен (Шихов и др., 2016b).

УСТОЙЧИВОСТЬ И РЕАКТИВНОСТЬ ФСА РАСТЕНИЙ

“Устойчивость растений при действии экстремальных факторов определяется как их максимальная способность к сохранению гомеостаза и основных функций, обеспечивающих жизнедеятельность в этих условиях, к эффективной компенсации нарушенных функций, а также к максимально быстрому и эффективному их восстановлению после прекращения экстремального

воздействия” (Удовенко, 1988, стр. 5). Устойчивость организма тесно связана с его реактивностью, понимаемой как способность к максимально быстрой перестройке сложившегося действующего на данный момент функционального стереотипа в ответ на любые изменения внешней среды (Тарчевский и др., 1975; Шабала, Войнов, 1994). “Формирование ответной реакции ФСА на внешнее воздействие обусловлено свойствами отдельных элементов (частными реакциями) и характером взаимодействия между ними” (Тарчевский и др., 1975, стр. 9). При исследовании механизмов реактивности фотосинтезирующих систем изучают либо ответную реакцию как реактивность системы в целом, либо исследуют свойства и взаимоотношения отдельных частных реакций. Последний подход нашел более широкое распространение в исследованиях экологии и физиологии растений с помощью метода ИФХ (Mohammed et al., 1995; Fracheboud, Leipner, 2003; Kalajet et al., 2014, Гольцев и др., 2016). Однако, несмотря на широкое применение флуоресценции хлорофилла для фундаментальных и прикладных исследований, для оперативной оценки состояния фитоценозов более важны методы оценки реактивности системы в целом. В связи с этим разработка оперативных методов оценки устойчивости растений в фитоценозах и определение их интегральных реакций на неблагоприятные внешние воздействия является актуальной проблемой для экологической системы контроля фитоценозов и для фундаментальных исследований реактивности растений в природной среде. Для исследования состояния реактивности используют различные подходы и методические приемы: обычно учитывают изменение одного или нескольких показателей, характеризующих степень и особенности действия фактора на определенную функцию (Тарчевский и др., 1975; Удовенко, 1988; Lichtenthaler, Rinderle, 1988). Особый интерес вызывает развитие во времени ответной реакции фотосинтетического аппарата на действие неблагоприятного фактора (Веселовский и др., 1993; Шабала, Войнов, 1994). Изучение реактивности фотосинтетического аппарата представляет интерес по нескольким причинам: во-первых, оно позволяет обнаружить связи между различными процессами и приблизиться к пониманию механизмов регуляции различных функций ФСА. Под регуляцией понимается “такая внутренняя перестройка сложной системы при получении определенной сигнальной информации, которая направлена на обеспечение необходимого режима функционирования в новых условиях” (Рубин, 2007, стр. 5). Биофизический под-

ход к решению проблем регуляции состоит в анализе динамического поведения ФСА в ответ на внешние воздействия. Детально исследовать временной характер изменения свойств системы и прогнозировать характер ее ответа на внешние воздействия позволяет математическое моделирование динамики исследуемого процесса (Ризниченко, Рубин, 2007). Во-вторых, интегральные показатели, характеризующие реактивность регуляторных систем, тесно связаны с устойчивостью растений в неблагоприятных условиях (Веселова и др., 1993; Ушаков и др., 2007).

Важной отличительной чертой любого биологического организма является наличие обширной иерархической системы обратных связей (Чернышов, Гаджиев, 1983). Их наличие обуславливает возможность поддерживать ритмические режимы в системах физиологической регуляции, взаимную координацию и подстройку различных метаболических процессов, протекающих в одном и том же компартменте с различными скоростями (Ашофф, 1984). “Реализация фотосинтеза в растении определяется, с одной стороны, высокой функциональной активностью структур низких порядков (фотосинтетическая единица, хлоропласт, клетка), а с другой – сложной системой интеграции и кооперативных связей фотосинтеза с другими физиологическими функциями растительного организма” (Мокроносов, 1981, стр. 3). “Совокупность динамических регуляторных реакций, основанных на принципах отрицательной и положительной обратной связи, обеспечивает длительное функционирование хлоропласта и высокую стабильность при различных условиях освещения таких параметров, как отношения НАДФН/НАДФ⁺ и АТФ/АДФ в строме хлоропласта, а также скорости переноса электронов между фотосистемами, необходимых для согласованного протекания двух стадий фотосинтеза...” (Бухов, 2004, стр. 834). “...адаптивные возможности организма, определяющие его уровень устойчивости, могут оцениваться по многим физиологическим параметрам. Однако не все физиологические параметры четко отражают устойчивость. Поэтому для диагностических целей следует использовать оценку изменений таких характеристик организма, которые играют существенную роль именно в реализации потенциала его устойчивости” (Удовенко, 1988, стр. 6). Существует мнение, что “чем более раннее звено в цепи фотосинтетических реакций повреждается в результате воздействия какого-нибудь экстремального фактора, тем большие нарушения будут обнаруживаться в работе ФСА в целом. Если же повреждение затрагивает лишь одно из последних звеньев,

это приведет к меньшим нарушениям фотосинтетической функции. Для суждения о функционировании ФСА в целом необходимо использовать интегральные показатели. Если говорить строго, то можно говорить лишь о реактивности целостной системы (организма)" (Тарчевский и др., 1975, стр. 9).

В последнее время внимание исследователей при исследовании устойчивости организмов к стрессовым воздействиям привлекают интегральные показатели, прежде всего характеризующие реактивность регуляторных систем организмов (Ушаков и др., 2007). "Уже на уровне листьев растений проявляется интегрированная надклеточная система управления. Природа этой системы управления еще недостаточно исследована и включает процессы межклеточных взаимодействий, действие гормональных, ингибиторных и электрофизиологических сигналов" (Мокроносов, 1981, стр. 3). Биофизический подход к решению проблем регуляции сложных систем заключается в анализе динамического поведения системы в ответ на внешние воздействия. Считается, что "ответ сложной системы в основном определяется изменением ее общих динамических свойств, а взаимодействия между отдельными элементами системы играют подчиненную роль" (Рубин, 2007, стр. 5).

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА

В последние два десятилетия метод ИФХ в разных вариантах широко применяют для оценок устойчивости растений к некоторым видам стресса (Lichtenthaler, Rinderle, 1988; Roháček, 2002; Корнеев, 2002; Fracheboud, Leipner, 2003; Mohammed et al., 2003; Sayed, 2003). Благодаря неспецифическому характеру изменений ИФХ при действии на растения различных стрессоров, с помощью измерения флуоресценции хлорофилла можно определять наличие стресса, но не его тип, поскольку многие стрессоры действуют на функцию фотосистемы 2 подобным образом (Lichtenthaler, Rinderle, 1988; Lichtenthaler, 1990; Сааков, 2000; Mohammed et al., 2003; Sayed, 2003). Метод основан на эффекте Каутского (Lichtenthaler, 1992; Govindjee, 1995). После освещения адаптированных к темноте листьев растений первоначально в течение секунды наблюдается резкий подъем интенсивности флуоресценции хлорофилла – быстрая фаза (стадии O-I-D-P), а затем в течение нескольких секунд и минут постепенное снижение через определенные стадии P-S-M-T (медленная фаза) к стационарному уровню T (Kooten, Snel, 1990). Наибольший интерес для по-

нимания механизмов устойчивости и мониторинга состояния фотосинтетического аппарата растений в экстремальных условиях представляют параметры медленной стадии (P-S-M-T) ИФХ, так как они в большей степени связаны с биохимическими процессами фотосинтеза и вследствие своей природы – с более интегральным процессом – интенсивностью газообмена CO₂ на уровне листьев растений (Караваев и др., 1988; Lichtenthaler, Rinderle, 1988; Нестеренко, Сидько, 1993; Рубин, 2007). В одном из последних обзоров (Гольцев и др., 2016) приведена достаточно подробная информация о современном методе изучения фотосинтеза растений *in vivo*, основанном на измерении и анализе индукции флуоресценции хлорофилла. На основе параметров ИФХ дана мультипараметрическая оценка стрессовой реакции, учитывающая широкий спектр процессов, протекающих в растительной клетке. Для определения функционального состояния ФСА листьев растений и оценки степени изменений активности ФСА, как правило, используется комплекс характеристик, определяемых на основании измерений амплитудных параметров кривой ИФХ листьев растений с применением так называемых РАМ-флуориметров (Roháček, Barták, 1999; Roháček, 2002; Гольцев и др., 2016).

Измеряемые флуоресцентные параметры: F_0 – минимальная флуоресценция, зарегистрированная, когда все реакционные центры ФС II открыты; F_M – максимальная флуоресценция, излучаемая объектом, в котором все реакционные центры ФС II закрыты; F_p – максимальная флуоресценция хлорофилла в условиях ненасыщающего света; F_t – флуоресценция, излучаемая в момент времени t , с момента включения действующего света (ДС); F_T – стационарная флуоресценция. Параметр F_T (иногда обозначается как F_S) представляет интенсивность флуоресценции хлорофилла, которая излучается фотосинтезирующими объектами в условиях стационарного освещения. После темновой адаптации достижение стационарного состояния на индукционной кривой флуоресценции хлорофилла (уровень F_T) занимает около 3–5 мин.

Несмотря на то, что уровень флуоресценции хлорофилла определяется редокс-состоянием первичного акцептора ФС 2, основную роль в регуляции активности ФС 2 играет редокс-состояние пластохинонового пула (Веселовский, Веселова, 1990; Корнеев, 2002). В свою очередь редокс-состояние пластохинонового пула определяется соотношением скоростей реакций фотосинтеза, темнового и светового дыхания и других метабо-

лических процессов в растительной клетке (Семихатова, 1990).

Основная часть определяемых с помощью широко распространенных в настоящее время модулирующих флуориметров (так называемых РАМ-флуориметров) показателей ИФХ оценивают работу подсистем ФСА листа (Корнеев, 2002; Roháček, 2002). Однако для решения проблем устойчивости ФСА на уровне листьев растений к экстремальным воздействиям этих показателей оказывается недостаточно, особенно когда необходимо определять характер изменений в ФСА листьев растений с точки зрения обратимости повреждений (Lichtenthaler, Rinderle, 1988; Нестеренко и др., 2007). Для быстрого тестирования более простые и интегральные показатели могут иметь определенные преимущества при изучении реакций ФСА на неблагоприятные воздействия такой сложной функциональной системы, как лист растения.

В обзоре В.Н. Гольцева с соавт. (2016) анализируются и возможности ряда интегральных показателей, таких как

1) показатель квантовой эффективности фотосинтеза – отношение варибельной флуоресценции к максимальной: F_v/F_m , где $F_v = F_m - F_0$, причем F_m измеряется в момент мощной вспышки, насыщающей фотосинтез;

2) индекс спада флуоресценции $R_{fd} = (F_p - F_T)/F_T$, известный также как индекс жизнеспособности, где F_p – максимальная (в пределах фотоиндукционной кривой) флуоресценция хлорофилла в условиях ненасыщающего света. Величина R_{fd} более чувствительна к внешним воздействиям, чем величина F_v/F_m , и хорошо коррелирует с удельной скоростью фотосинтетической фиксации CO_2 в нормальных зеленых тканях (Lichtenthaler, Rinderle, 1988; Roháček, 2002). Часто вместо R_{fd} используют отношение $F_p/F_T = R_{fd} + 1$ (Lichtenthaler, Rinderle, 1988; Нестеренко, Сидько, 1993; Kharuk et al., 1994; Sestak, Siffel, 1997; Нестеренко и др., 2007);

3) коэффициент адаптации к стрессу – параметр A_p , который определяют при измерении параметра R_{fd} одновременно на двух длинах волн (на 690 и 730 нм) (Lichtenthaler, Rinderle, 1988; Гольцев и др., 2016). Кроме этих показателей важными характеристиками активности ФСА листьев растений являются показатели Φ_{PSII} – квантовый выход фотохимической реакции в ФС II и ETR – поток электронов через фотосистемы.

$$\Phi_{PSII} = (F_M - F_T)/F_M = \Delta F/F_M. \quad (1)$$

Φ_{PSII} – наиболее популярный и важный параметр, который представляет собой соотношение числа квантов, используемых в фотохимических превращениях, к общему числу поглощенных квантов ФАР (Genty et al., 1989).

В лабораторных условиях обнаружена линейная зависимость между значениями параметра Φ_{PSII} и скоростью фиксации двуокиси углерода в процессе фотосинтеза. Расхождения между этими параметрами может произойти в условиях стресса в связи с изменениями эффективности карбоксилирования при активировании фотодыхания или появлении псевдоциклического переноса электрона (Fryer et al., 1998). Как правило, при засухе происходит закрывание устьиц и снижение эффективности реакции ассимиляции CO_2 и как следствие – сокращение потребления АТФ и НАДФ Н. Это оказывает влияние на замедление переноса электронов в обеих фотосистемах и должно привести к снижению величины параметра Φ_{PSII} (Гольцев и др., 2016). ETR – поток электронов через фотосистемы, определяемый по формуле:

$$ETR = \Phi_{PSII} \times 0.84 \times 0.50 \times PPF. \quad (2)$$

Параметр ETR является произведением квантового выхода (Φ_{PSII}) и плотности потока освещения (PPFD), измеряемого в мкмоль (фотонов ФАР)/ $m^2 \cdot c$, умноженных на коэффициент 0.50. Стрессовые факторы снижают значение этого параметра, например, скорость электронного транспорта в картофеле в условиях засухи была значительно ниже, чем в контрольной группе (Basu et al., 1998).

Однако в работе В.Н. Гольцева с соавт. (2016) не рассматриваются возможности временных параметров, в том числе параметра времени полуспада кривой медленной стадии ИФХ $T_{0.5}$ (Kharuk et al., 1994; Šesták, Šiffel, 1997; Nesterenko et al., 2012; Птушенко и др., 2013). В то же время в ряде работ (Птушенко и др., 2013; Лысенко и др., 2014) отмечается, что кинетические характеристики фотосинтетических процессов в листьях растений (времена фотоиндуцированного окисления R_{700} , временные параметры кривой ИФХ) более чувствительны к условиям произрастания растений, чем стационарные показатели.

В работе Т.В. Нестеренко с соавт. (2007) был сделан анализ параметров ИФХ, применяемых для определения состояния ФСА листьев растений и диагностики общей устойчивости растений к длительным стрессовым воздействиям. Рассмотрены перспективы использования ИФХ для определения перехода от обратимых к необрати-

мым структурно-функциональным изменениям ФСА растений при длительном стрессе. На основании наших экспериментов и литературных данных мы предложили онтогенетический подход для определения общей устойчивости растений к длительным стрессовым воздействиям. Представленное в работе исследование включало изучение динамики параметра F_p/F_T (как пример) и интегральных физиологических листовых характеристик (скорости фотосинтеза, ростовых характеристик листа) в контролируемых условиях светокультуры. Величины флуоресцентных отношений F_v/F_m , R_{fd} и F_p/F_T наиболее часто используются для сравнительных исследований различий между полностью активными и находящимися в состоянии стресса растениями. Однако по характеру изменений отношений F_v/F_m , R_{fd} и F_p/F_T трудно оценивать степень необратимых изменений ФСА при старении и при стрессах (Lichtenthaler, Rinderle, 1988; Венедиктов и др., 1999), так как величины этих флуоресцентных отношений изменяются с возрастом листа (Šesták, Šiffel, 1997; Нестеренко, Тихомиров, 2003, 2005). Считается, что при слишком большом наборе переменных, которые используются параллельно и конкурируют за место наиболее адекватного, предпочтение надо отдавать таким показателям, которые удовлетворяют требованиям интегральности, неспецифичности отклика на воздействие, возможности однозначной физиологической интерпретации (Булгаков, 2002). В работе Нестеренко с соавт. (Nesterenko et al., 2019) был поставлен вопрос: возможна ли интегральная экспресс-оценка состояния ФСА по минимальному набору флуоресцентных параметров и какими свойствами эти параметры или характеристики должны обладать? По-видимому, 1) величина их не должна слишком меняться в онтогенезе листа, по крайней мере, после формирования листа и до начала его старения; 2) величина должна быть достаточно стабильной при вариации по интенсивности возбуждающего флуоресценцию света в широком диапазоне (Nesterenko et al., 2012, 2015); 3) предлагаемый параметр должен быть чувствительным к изменению активности ФСА при стрессовых воздействиях и восстановлению состояния ФСА после прекращения воздействия (Li et al., 2013; Шихов и др., 2016б).

Мы предположили, что в число таких параметров может войти параметр $T_{0.5}$ (Нестеренко, Сидько, 1984; Kharuk et al., 1994; Nesterenko et al., 2012; Птушенко и др., 2013; Nesterenko et al., 2019), представляющий время полуспада интенсивности флуоресценции хлорофилла в течение медленной стадии индукции флуоресценции. По-ви-

димому, его можно рассматривать как наиболее простой показатель реактивности регуляторных систем ФСА листа. Спад кривой ИФХ отражает регуляторные процессы фотосинтеза: а) усиление нефотохимического тушения флуоресценции, связанное с увеличением диссипации поглощаемой энергии в ФС II, б) активацию цикла Кальвина, приводящую к ускорению оттока электронов от ФС I, в) перераспределение светособирающего антенного комплекса между ФС II и ФС I (Adams, Demmig-Adams, 2004). Медленные изменения флуоресценции хлорофилла связаны не только с фотохимическим использованием света, но также содержат информацию о механизмах, вовлеченных в защиту ФСА от повреждения радикалами, механизмах регуляции тепловой деградации поглощенной световой энергии (Бухов, 2004; Хебер и др., 2007; Jahns, Holzwarth, 2012). “Время полуспада кривой ИФХ ($T_{0.5}$), таким образом представляет собой интегральную характеристику скорости активации ряда фотоассимиляционных и фотозащитных процессов в листе” (Птушенко и др., 2013). “Целостная система первичных процессов фотосинтеза (ППФ), обладающая функциональной автономией и сложной организацией, характеризуется своеобразными механизмами переноса электрона и динамическими способами саморегуляции своего состояния” (Рубин, 2007, стр. 426). “Запускаемая” светом последовательность фотосинтетических процессов, можно “тестировать” систему и наблюдать кинетику переходных процессов состояний отдельных ее компонентов (Ризниченко, Рубин, 2007, стр. 166).

“Наиболее перспективным направлением изучения, прогнозирования и повышения устойчивости организмов к стрессовым воздействиям считается оценка исходного функционального состояния регуляторных систем организма, сопоставление их реакций на тестирующие воздействия” (Ушаков и др., 2007, стр. 10). Считается, что “косвенно на основе изменения периода полувосстановления в системе после тестового стрессового воздействия можно оценивать состояние регуляторных систем организма” (Ушаков и др., 2007, стр. 365).

Действие возбуждающего флуоресценцию хлорофилла света на фотосинтетический аппарат (ФСА) адаптированных к темноте листьев растений представляет собой, по-видимому, также тестирующее воздействие, которое можно попытаться использовать для оценки состояния регуляторных систем ФСА листа.

Для оценки величины реакции исследуемого параметра ИФХ на рассматриваемое воздействие

применяют интегральный логарифмический показатель I

$$I = \lg(N_i/N_{i0}), \quad (3)$$

где N_i — значение соответствующего параметра при исследуемом воздействии, N_{i0} — значение параметра в начале исследования (Ушаков и др., 2007; Nesterenko et al., 2012).

Прогноз устойчивости строится на предположении, что фотосинтетический аппарат тех листьев, у которых имеется определенная исходная (до начала воздействия) недостаточность регуляторных систем, будет менее устойчивым к экстремальному воздействию. “Математически это может выражаться в том, что у наиболее устойчивых образцов логарифмический показатель $I = \lg(N_{it}/N_{0i})$ приблизится к 0 (т.е. практически отсутствуют какие-либо значимые дефекты регуляторных систем, а их функциональная активность оптимальна)” (Ушаков и др., 2007, стр. 391). В статье Нестеренко с соавт. (Nesterenko et al., 2012) при использовании тестового воздействия — света разной интенсивности (диапазон 20–80 Вт/м² ФАР) при регистрации кривых ИФХ листьев редиса было показано, что наименьшие значения параметра $T_{0.5}$ наблюдали для зрелого 18-суточного листа (–0.11). Это может, по-видимому, свидетельствовать о большей устойчивости его регуляторных систем к воздействию света высокой интенсивности по сравнению с устойчивостью для молодого листа, для которого значение интегрального логарифмического показателя для параметра $I(T_{0.5})$ равно –0.55, что связано, вероятно, с меньшей устойчивостью регуляторных систем его ФСА к световому воздействию или менее развитыми защитными механизмами от фотоингибирования (Demmig-Adams, Adams, 1992). Считается, что “скорость разворачивания защитных механизмов при умеренных интенсивностях света имеет решающее значение для устойчивости фотосинтетического аппарата растения в первую очередь на начальном этапе адаптации к свету, происходящем преимущественно в течение первой минуты освещения” (Птушенко и др., 2013).

ОЦЕНКА РЕАКЦИИ ФСА ЛИСТЬЕВ НА СТАРЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИФХ F_p/F_T И $T_{0.5}$

Анализ данных по возрастной зависимости параметра $T_{0.5}$ и отношения F_p/F_T показал наличие периода относительной стабильности их значений, который соответствует периоду зрелости листьев и имеет разную продолжительность для отдельных видов растений, что подтверждается ли-

тературными данными (Нестеренко, Сидько, 1984; Kharuk et al., 1994; Šesták, Šiffel, 1997; Нестеренко, Тихомиров, 2003, 2005; Романова и др., 2011). В работе Нестеренко с соавт. (Nesterenko et al., 2019) значения параметра $T_{0.5}$ для почти сформировавшихся листьев огурца, пшеницы и редиса с площадью 80–90% от максимальной площади листа (Мокроносов, 1981) имели близкие значения. На протяжении онтогенеза листьев растений после их формирования и до момента старения для трех видов растений изменения значений $T_{0.5}$ в течение примерно двух недель (с 6–7 и до 20–22 сут) не превышали 80%. Только после старения листьев наблюдалось резкое повышение значений. Так для 25-суточного листа пшеницы 5-го яруса значение $T_{0.5}$ увеличивалось по сравнению со зрелыми листьями (16–20-суточными) более чем в 2 раза. Известно также, что некоторые авторы рассматривают старение растений как один из видов стресса (имеется ряд эндогенных изменений, ухудшающих внутреннюю среду) (Thomas, Stoddart, 1980; Нестеренко и др., 2007). Для оценки величины реакции исследуемых параметров ИФХ на рассматриваемое воздействие (старение) был применен интегральный логарифмический показатель I , который рассчитывался по формуле (3).

Сравнение реакции показателей ИФХ (F_p/F_T , $T_{0.5}$) листьев растений огурца, редиса и пшеницы на старение листьев с помощью интегрального логарифмического параметра I (табл. 1) показало близкие значения $I(T_{0.5})$ для трех видов растений в широком возрастном диапазоне. В то же время значения логарифмического показателя для отношения F_p/F_T для тех же растений отличались существенно (табл. 1), что можно объяснить разным характером возрастной зависимости параметра F_p/F_T по сравнению с параметром $T_{0.5}$ (Nesterenko et al., 2012) и тем, что период относительной стабильности значений параметров ИФХ соответствует периоду зрелости листьев и имеет разную продолжительность для отдельных видов растений (Kharuk et al., 1994; Šesták, Šiffel, 1997; Нестеренко, Тихомиров, 2003, 2005).

В работах Нестеренко с соавт. (Нестеренко 2014, 2015; Nesterenko et al., 2015) на примере листьев пшеницы *Triticum aestivum* L. изучали возрастную зависимость основных характеристик ИФХ и влияние на их значения интенсивности действующего света (ДС). Определяли максимальный квантовый выход ФС II (F_v/F_m), эффективный квантовый выход ФС II – Φ_{PSII} ; qP , qN и NPQ – показатели фото- и нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла, соответственно; отношение F_p/F_T и индекс жизнеспособ-

Таблица 1. Оценка величины реакции показателей ИФХ (F_p/F_T и $T_{0.5}$) листьев растений огурца, редиса и пшеницы на старение листьев с помощью интегрального логарифмического показателя I (отн. ед.)

Растение	Возраст листа, сут	Площадь, % от макс.	$T_{0.5}$, с	F_p/F_T , отн. ед.	$I(T_{0.5})$	$I(F_p/F_T)$
Огурец	7	75	8.2 ± 1.2	3.5 ± 0.2	0.25 ± 0.01	-0.26 ± 0.02
	22	100	14.6 ± 1.6	1.9 ± 0.5		
Редис	6	80	12.3 ± 1.5	3.3 ± 0.2	0.22 ± 0.02	-0.37 ± 0.03
	24	100	20.5 ± 1.0	1.4 ± 0.2		
Пшеница	7	80	10.1 ± 1.7	3.5 ± 0.2	0.21 ± 0.02	-0.16 ± 0.02
	20	100	16.2 ± 2.4	2.4 ± 0.2		

Примечание. Интегральный логарифмический показатель $I = \lg(N_i/N_{i0})$, где N_i – значение соответствующего параметра ИФХ стареющих листьев (20–23 сут); N_{i0} – значение параметра ИФХ зрелых листьев (7–9–суточных). Расчет интегрального логарифмического показателя I на основании данных работы Нестеренко с соавт. (Nesterenko et al., 2019).

ности R_{fd} . При невысокой интенсивности ДС, (примерно $380 \text{ мкмоль}/(\text{м}^2 \cdot \text{с})$) для флуоресцентных показателей влияние возраста листьев практически не сказывалось на их значениях, кроме R_{fd} . Увеличение интенсивности ДС до $580 \text{ мкмоль}/(\text{м}^2 \cdot \text{с})$ ФАР и выше приводило к существенному влиянию возраста листа на значения флуоресцентных показателей. Наиболее чувствительными к возрастному состоянию листьев оказалось отношение F_p/F_T и показатели нефотохимического тушения флуоресценции: NPQ, qN (Nesterenko et al., 2015).

ОЦЕНКА РЕАКЦИИ ФСА ЛИСТЬЕВ РЕДИСА НА ИЗМЕНЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ ДЕЙСТВУЮЩЕГО СВЕТА С ПОМОЩЬЮ F_p/F_T И $T_{0.5}$

Свет для хлоропластов рассматривается и в качестве субстрата фотосинтеза, и в качестве раздражителя (Тарчевский и др., 1975).

В работе Нестеренко с соавт. (Nesterenko et al., 2012) величина $T_{0.5}$ для зрелого 18-суточного листа редиса оставалась достаточно стабильной при вариации интенсивности возбуждающего флуоресценцию света в широком диапазоне ($20\text{--}80 \text{ Вт}/\text{м}^2$). Из-

менения не превышали 26%. В то же время для усредненного листа растения редиса (с учетом реакции разновозрастных листьев) значения логарифмического показателя для $T_{0.5}$ выше, чем для отношения F_p/F_T (табл. 2), что свидетельствует о большей чувствительности этого параметра к изменению интенсивности света в целом для растения, что важно при выборе более интегральной характеристики реакции ФСА на уровне растений.

ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ИЗМЕНЕНИЙ ЗНАЧЕНИЙ $T_{0.5}$ ПРИ ИЗМЕРЕНИИ ИФХ ЛИСТЬЕВ ПРИ ВОДНОМ ДЕФИЦИТЕ

Поведение параметра $T_{0.5}$ при стрессовом воздействии изучали на примере слабого обезвоживания. По данным работы В.Н. Шихова с соавторами (2016б) в условиях водного дефицита уже на третьи сутки значения $T_{0.5}$ для листьев листовой капусты резко возрастали (в 2.4 раза) и восстанавливались до прежних значений быстрее других характеристик ФСА (например, эффективный квантовый выход ФС II – Φ_{PSII} , ETR) при восстановлении полива растений. Это может означать отсутствие нарушений в системе регуляции ФСА листьев растений, что подтверждается также вос-

Таблица 2. Интегральный логарифмический показатель I (отн. ед.) параметров F_p/F_T , $T_{0.5}$ разновозрастных листьев редиса при увеличении интенсивности света от 20 (40) до 80 Вт/м² ФАР

Параметры ИФХ	Интенсивность возбуждающего света при начальном измерении параметра ИФХ, Вт/м ² ФАР	
	20	40
$T_{0.5}$	0.30 ± 0.02	0.15 ± 0.02
F_p/F_T	0.19 ± 0.02	0.02 ± 0.01

Примечание. Вычисление интегрального логарифмического показателя I см. табл. 1, где N_i – значение соответствующего параметра ИФХ листьев редиса при интенсивности действующего света 80 Вт/м² ФАР, N_{i0} – значение параметра ИФХ при 20 (или 40) Вт/м² ФАР. Расчет интегрального логарифмического показателя I на основании данных работы Нестеренко с соавт. (Nesterenko et al., 2012).

Таблица 3. Оценка реакции фотосинтетического аппарата листьев капусты сорта Бансэй Маруба на стрессовое воздействие (водный дефицит) и репарацию (оводнение) с помощью интегрального логарифмического показателя (I , отн. ед.) характеристик ИФХ ($T_{0.5}$, ETR, Φ_{PSII})

Параметры ИФХ	Условия		
	водный дефицит	репарация	
	четверо суток	одни сутки	четверо суток
$T_{0.5}$	0.42 ± 0.03	-0.32 ± 0.03	-0.40 ± 0.03
ETR	-0.13 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.19 ± 0.02
Φ_{PSII}	-0.13 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.18 ± 0.02

Примечание. Вычисление интегрального логарифмического показателя I см. табл. 1, где N_i – значение соответствующего параметра в результате воздействия (либо репарации–оводнения), N_{i0} – значение параметра в начале исследования (или предыдущего воздействия – 4-суточного водного дефицита). Расчет интегрального логарифмического показателя I на основании данных работы В.Н. Шихова с соавт. (2016б).

становлением скорости электронного транспорта через фотосистему 2 после кратковременного водного дефицита (Li et al., 2013; Шихов и др., 2016б). Количественное сравнение чувствительности показателей ИФХ на стрессовое воз-

действие с помощью интегрального логарифмического показателя (I) приводится в табл. 3. Значения I для $T_{0.5}$ были самыми высокими как при обезвоживании, так и при репарации по сравнению с показателями Φ_{PSII} и ETR.

Сравнение параметров флуоресценции хлорофилла двух сортов сахарной свеклы с разной устойчивостью их ФСА к засухе показало разную чувствительность параметров (F_0 , F_v/F_m , qP , qN) на данный стресс (Li et al., 2013). Наиболее чувствительным к водному стрессу среди параметров и характеристик ФСА оказался коэффициент нефотохимического тушения qN (изменения значений почти в 3 раза) (Li et al., 2013).

В ранее проведенной нами работе было показано, что изменения этой характеристики в онтогенезе листьев растений пшеницы находятся в пределах 30% (Нестеренко и др., 2015), что сопоставимо с изменениями значений параметра $T_{0.5}$ (табл. 1). По характеру изменений значений в онтогенезе и чувствительности к стрессовым воздействиям показатели ИФХ qN и $T_{0.5}$ сопоставимы, однако преимущество $T_{0.5}$ заключается в более простых условиях измерения по сравнению с qN (Nesterenko et al., 2019).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наблюдаемые нами в экспериментах особенности в поведении $T_{0.5}$ и сравнение его с наиболее чувствительными к стрессам показателями ИФХ (qN , ETR, Φ_{PSII} и F_p/F_T) дают основания предложить применение $T_{0.5}$ для косвенной оценки изменения активности ФСА в ситуациях, когда необходим оперативный интегральный контроль за состоянием ФСА. Для установления количественных закономерностей между активностью ФСА и флуоресцентным параметром $T_{0.5}$ в конкретных стрессовых условиях необходимы дальнейшие исследования.

На основании полученных результатов (табл. 1–3) и анализа литературных данных по показателям ИФХ можно сделать вывод о перспективности применения параметра $T_{0.5}$, представляющего время полуспада интенсивности флуоресценции хлорофилла в течение медленной стадии ИФХ, как одной из интегральных и оперативных косвенных оценок изменения активности ФСА листьев высших растений при определении его устойчивости к стрессовым воздействиям.

Работа проведена в рамках выполнения госзадания по теме № 56.1.4 Раздел VI Программы фундаментальных научных исследований госакадемий наук на 2013–2020 гг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Алексеев А.А., Белов А.А., Киржанов Д.В., Кукушкин А.К., 2012. Теоретическое исследование флуоресценции

фотосинтетических пигментов при сложной зависимости интенсивности возбуждающего света от времени // Биофизика. Т. 57. С. 83–87.

Ашофф Ю., 1984. Биологические ритмы. Т. 1. М.: Мир. 412 с.

Булгаков Н.Г., 2002. Индикация состояния природных экосистем и нормирование факторов окружающей среды: обзор существующих подходов // Успехи соврем. биологии. Т. 122. № 2. С. 115–135.

Бухов Н.Г., 2004. Динамическая световая регуляция фотосинтеза // Физиология растений. Т. 51. № 6. С. 825–837.

Венедиктов П.С., Волгин С.Л., Казимирко Ю.В., Кренделева Т.Е., Кукарских Г.П., Макарова В.В., Лаврухина О.Г., Погосян С.И., Яковлева О.В., Рубин А.Б., 1999. Использование флуоресценции хлорофилла для контроля физиологического состояния зеленых насаждений в городских экосистемах // Биофизика. Т. 44. № 6. С. 1037–1047.

Веселовский В.А., Веселова Т.В., 1990. Люминесценция растений. Теоретические и практические аспекты. М.: Наука. 200 с.

Веселовский В.А., Веселова Т.В., Чернавский Д.С., 1993. Стресс растения. Биофизический подход // Физиология растений. Т. 40. № 4. С. 553–557.

Гольцев В.Н., Каладжи Х.М., Паунов М., 2016. Использование переменной флуоресценции для оценки физиологического состояния фотосинтетического аппарата растений // Физиология растений. Т. 63. № 6. С. 881–907.

Караваев В.А., Шагурина Т.Л., 1988. Медленная индукция флуоресценции и CO_2 -газообмен листьев бобов в присутствии различных химических агентов // Физиология растений. Т. 35. № 5. С. 962–968.

Корнеев Д.Ю., 2002. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла. Киев: Алтерпресс. 188 с.

Кочубей С.М., Шевченко В.В., Корнеев Д.Ю., 2006. Структурная организация и функциональные особенности световой фазы фотосинтеза. К.: Логос. 176 с.

Лысенко В.С., Вардуни Т.В., Косенко П.О., Косенко Ю.В., Чугуева О.И., Семин Л.В., Горлачев И.А., Тарасов Е.К., Гуськова О.С., 2014. Исследование кинетических параметров флуоресценции хлорофилла в листьях *Ficus benjamina* методом видеорегистрации // Физиология растений. Т. 61. С. 449–453.

Мокронос А.Т., 1981. Онтогенетический аспект фотосинтеза. М.: Наука. 196 с.

Нестеренко Т.В., Сидько Ф.Я., 1984. Индукция флуоресценции хлорофилла *a* в онтогенезе флаг-листа пшеницы // Биофизические исследования экосистем / Отв. ред. Терсков И.А. Новосибирск: Наука СО АН СССР. С. 83–88.

Нестеренко Т.В., Сидько Ф.Я., 1993. О количественном описании медленной индукции флуоресценции

- хлорофилла в онтогенезе листьев высших растений // Физиология растений. Т. 40. № 1. С. 10–15.
- Нестеренко Т.В., Тихомиров А.А.*, 2003. Онтогенетический подход в оценке устойчивости растений к стрессовому воздействию методом индукции флуоресценции хлорофилла // ДАН. Т. 388. № 1. С. 119–122.
- Нестеренко Т.В., Тихомиров А.А.*, 2005. Применение онтогенетического подхода для флуоресцентных исследований фотосинтетического аппарата растений в стрессовых условиях // Биофизика. Т. 50. № 2. С. 335–340.
- Нестеренко Т.В., Тихомиров А.А., Шихов В.Н.*, 2007. Индукция флуоресценции хлорофилла и оценка устойчивости растений к неблагоприятным воздействиям // Журн. общ. биологии. Т. 68. № 6. С. 455–469.
- Нестеренко Т.В., Шихов В.Н., Тихомиров А.А.*, 2014. Световая зависимость медленной индукции флуоресценции хлорофилла в онтогенезе листьев растений пшеницы // ДАН. Т. 454. № 6. С. 729–732.
- Нестеренко Т.В., Шихов В.Н., Тихомиров А.А.*, 2015. Флуоресцентные показатели возрастных изменений фотосинтетического аппарата листьев пшеницы // Физиология растений. Т. 62. № 3. С. 332–339.
- Птушенко В.В., Караваев В.А., Солнцев М.К., Тихонов А.Н.*, 2013. Биофизические методы экологического мониторинга. Фотосинтетические показатели листьев древесных растений в условиях города Москвы // Биофизика. Т. 58. Вып. 2. С. 312–320.
- Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б.*, 2007. Модели регуляции фотосинтетического электронного транспорта // Проблемы регуляции в биологических системах. Биофизические аспекты / Под ред. Рубина А.Б. М.; Ижевск: НИЦ “Регулярная и хаотическая динамика”, Ин-т компьютерных исследований. С. 165–194.
- Романова А.К., Семенова Г.А., Новичкова Н.С., Игнатьев А.Р., Мудрик В.А., Иванов Б.Н.*, 2011. Физиолого-биохимические и флуоресцентные показатели старения листьев сахарной свеклы в вегетативной фазе роста // Физиология растений. Т. 58. С. 221–233.
- Рубин А.Б.*, 2007. Введение // Проблемы регуляции в биологических системах. Биофизические аспекты / Под ред. Рубина А.Б. М.; Ижевск: НИЦ “Регулярная и хаотическая динамика”, Ин-т компьютерных исследований. 480 с.
- Сааков В.С.*, 2000. Концепция энергетических основ устойчивости зеленой клетки к действию экстремальных факторов внешней среды // ДАН. Т. 375. № 2. С. 278–285.
- Семихатова О.А.*, 1990. Энергетика дыхания растений в норме и при экологическом стрессе. Л.: Наука. 73 с.
- Тарчевский И.А., Безуглов В.К., Заботин А.И., Петров В.Е.*, 1975. Реактивность фотосинтетического аппарата. Казань: Изд-во Казан. ун-та. 104 с.
- Удовенко Г.В.*, 1988. Общие требования к методам и принципам диагностики устойчивости растений к стрессам // Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям / Под ред. Удовенко Г.В. Л.: ВИР. С. 5–10.
- Ушаков И.Б., Штемберг А.С., Шафиркин А.В.*, 2007. Реактивность и резистентность организма млекопитающих. М.: Наука. 493 с.
- Хебер У., Ланге О.Л., Шувалов В.А.*, 2007. Запасание и диссипация энергии света растениями как взаимодополняющие процессы, вовлеченные в поддержание жизни растения // Проблемы регуляции в биологических системах. Биофизические аспекты / Под ред. Рубина А.Б. М.; Ижевск: НИЦ “Регулярная и хаотическая динамика” Ин-т компьютерных исследований. С. 195–222.
- Чернышев М.К., Гаджиев М.Ю.*, 1983. Математическое моделирование иерархических систем. М.: Наука. 190 с.
- Шабала С.Н., Войнов О.А.*, 1994. Динамика физиологических характеристик растений как элемент системы экологического мониторинга // Успехи соврем. биологии. Т. 114. № 2. С. 144–159.
- Шихов В.Н., Величко В.В., Нестеренко Т.В., Тихомиров А.А.*, 2011. Онтогенетический подход при оценке методом индукции флуоресценции хлорофилла реакции растений чужды на условия культивирования // Физиология растений. Т. 58. № 2. С. 290–295.
- Шихов В.Н., Нестеренко Т.В., Тихомиров А.А.*, 2016а. Влияние света разной интенсивности на флуоресценцию хлорофилла в листьях пшеницы. Использование РАМ-флуорометра // Физиология растений. Т. 63. № 3. С. 443–449.
- Шихов В.Н., Нестеренко Т.В., Тихомиров А.А.*, 2016б. Использование онтогенетического подхода при регистрации кривой Каутского в ходе стрессового воздействия на растения листовой капусты // Вестн. КрасГАУ. № 7. С. 114–120.
- Ashraf M., Harris P.J.C.*, 2013. Photosynthesis under stressful environments: An overview // Photosynthetica. V. 51. P. 163–190.
- Adams W.W., Demmig-Adams B.*, 2004. In chlorophyll a fluorescence. A signature of photosynthesis / Eds Papa-georgiou G.C., Govindjee E. Dordrecht: Springer. P. 583–604.
- Basu P.S., Sharma A., Sukumaran N.P.*, 1998. Changes in net photo-synthetic rate and chlorophyll fluorescence in potato leaves induced by water stress // Photosynthetica. V. 35. P. 13–19.
- Demmig-Adams B., Adams W.W.*, 1992. III. Photoprotection and other responses of plants to high light stress // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. V. 43. P. 599–626.
- Fracheboud Y., Leipner J.*, 2003. The application of chlorophyll fluorescence to study light, temperature, and drought stress // Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology / Eds DeEll J.R., Toi-

- vonen P.M.A. Boston; Dordrecht; L.: Kluwer Academic Publishers. P. 125–150.
- Fryer M.J., Andrews J.R., Oxborough K., Blowers D.A., Baker N.R., 1998. Relation between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport, and active CO₂ metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature // *Plant Physiol.* V. 116. P. 571–580.
- Genty B., Briantais J.-M., Baker N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence // *Biochim. Biophys. Acta.* V. 990. P. 87–92.
- Govindjee E., 1995. Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll a fluorescence // *Aust. J. Plant Physiol.* V. 22. P. 131–160.
- Jahns P., Holzwarth A.R., 2012. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II // *BBA-Bioenergetics.* V. 1817. P. 182–193.
- Kalaji H.M., Schansker G., Ladle R.J., Goltsev V., Bosa K. et al., 2014. Frequently asked questions about *in vivo* chlorophyll fluorescence: Practical issues // *Photosynth. Res.* V. 122. P. 121–158.
- Kalaji H.M., Schansker G., Brestic M., Bussotti F., Calatayud A., et al., 2017. Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel // *Photosynth. Res.* V. 132. P. 13–66.
- Kharuk V.I., Morgun V.N., Rock B.N., Williams D.L., 1994. Chlorophyll fluorescence and delayed fluorescence as potential tools in remote sensing: A reflection of some aspects of problems in comparative analysis // *Remote Sens. Environ.* V. 47. P. 98–105.
- Kooten O., van, Snel J.F., 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology // *Photosynth. Res.* V. 25. № 3. P. 147–150.
- Lichtenthaler H.K., 1990. Applications of chlorophyll fluorescence in stress physiology and remote sensing // *Applications of Remote Sensing in Agriculture* / Eds Steven M.D., Clark J.A. L.: Butterworth Scientific. P. 287–305.
- Lichtenthaler H.K., 1992. The Kautsky effect: 60 years of chlorophyll fluorescence induction kinetics // *Photosynthetica.* V. 27. № 1. P. 45–55.
- Lichtenthaler H.K., Rinderle U., 1988. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants // *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* V. 19. P. S29–S85.
- Li G.L., Wu H.X., Sun Y.Q., Zhang S.Y., 2013. Response of chlorophyll fluorescence parameters to drought stress in sugar beet seedlings // *Russ. J. Plant Physiol.* V. 60. P. 337–342.
- Lyu H., Lazár D., 2017a. Modeling the light-induced electric potential difference ($\Delta\Psi$), the pH difference (ΔpH) and the proton motive force across the thylakoid membrane in C₃ leaves // *J. Theor. Biol.* V. 413. P. 11–23.
- Lyu H., Lazár D., 2017b. Modeling the light-induced electric potential difference $\Delta\Psi$ across the thylakoid membrane based on the transition state rate theory // *BBA-Bioenergetics.* V. 1858. P. 239–248.
- Mohammed G.H., Binder W.D., Gillies S.L., 1995. Chlorophyll fluorescence: A review of its practical forestry applications and instrumentations // *Scand. J. Forest Res.* V. 10. P. 383–410.
- Mohammed G.H., Pablo-Zarco-Tejada, Miller J.R., 2003. Applications of chlorophyll fluorescence in forestry and ecophysiology // *Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology* / Eds DeEll J.R., Toivonen P.M.A. Boston-Dordrecht-London: Kluwer Academic Publishers. P. 79–124.
- Nesterenko T.V., Tikhomirov A.A., Shikhov V.N., 2006. Ontogenetic approach to the assessment of plant resistance to prolonged stress using chlorophyll fluorescence induction method // *Photosynthetica.* V. 44. P. 321–332.
- Nesterenko T.V., Tikhomirov A.A., Shikhov V.N., 2012. Influence of excitation light intensity and leaf age on the slow chlorophyll fluorescence transient in radish // *Biophysics.* V. 57. № 4. P. 464–468.
- Nesterenko T.V., Shikhov V.N., Tikhomirov A.A., 2015. Effect of light intensity on the age dependence of nonphotochemical fluorescence quenching in wheat leaf // *Photosynthetica.* V. 53. № 4. P. 617–620.
- Nesterenko T.V., Shikhov V.N., Tikhomirov A.A., 2019. Estimation of changes in the activity of photosynthetic apparatus of plant leaves based on half-time of fluorescence intensity decrease // *Photosynthetica.* V. 57. № 1. P. 132–136.
- Roháček K., 2002. Chlorophyll fluorescence parameters: The definitions, photosynthetic meaning and mutual relationships // *Photosynthetica.* V. 40. № 1. P. 13–29.
- Roháček K., Barták M., 1999. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: Basic concepts, useful parameters, and some applications // *Photosynthetica.* V. 37. № 3. P. 339–363.
- Sayed O.H., 2003. Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research // *Photosynthetica.* V. 41. № 3. P. 321–330.
- Šesták Z., Šiffel P., 1997. Leaf-age related differences in chlorophyll fluorescence // *Photosynthetica.* V. 33. № 3. P. 347–369.
- Tikhomirov A.A., Sid'ko F.Ya., 1982. Photosynthesis and structure of radish and wheat canopies as affected by radiation of different energy and spectral composition // *Photosynthetica.* V. 16. P. 191–195.
- Thomas H., Stoddart J.L., 1980. Leaf senescence // *Annu. Rev. Plant Physiol.* V. 31. P. 83–111.

The fluorescence method for determining of photosynthetic apparatus reactivity in plant leaves

T. V. Nesterenko^{a, *}, V. N. Shikhov^a, A. A. Tikhomirov^a

^a*Institute of Biophysics, Siberian Branch of RAS,
660036 Krasnoyarsk, Academgorodok 50/50, Russia*

**e-mail: tv-nesterenko@mail.ru*

Presently, the most promising way of studying, forecasting, and enhancing of organisms' tolerance to harsh environmental impacts is considered to be the estimation of initial functional state of an organism's regulatory systems. To resolve the problem of photosynthetic apparatus (PSA) tolerance to harsh impacts at the level of such a complicated functional system as a plant leaf, it is necessary to assess integral responses of the leaf's PSA to the impact. At that, simple and versatile traits may have certain advantages. At present, chlorophyll fluorescence seems to be one of the main indices of PSA activity, which can be measured relatively fast and easy. One of the possible approaches to operational integrative assessment of PSA activity may consist in usage of the parameters introduced for the curves of chlorophyll fluorescence induction (CFI) slow phase. Temporal patterns of CFI are of special interest. The simplest index $T_{0.5}$ (i.e., half-time of chlorophyll fluorescence intensity decrease during the slow phase of CFI) appears to be an integral characteristic of activation rate with regard to a number of photo-assimilation and photo-protective processes in leaves. On basis of the studies, conducted earlier, and published data, we have analyzed the behavior of $T_{0.5}$ parameter with comparison to other CFI traits (namely: qN – non-photochemical quenching coefficient, ETR – electron transport rate, Φ_{PSII} – effective quantum yield of PSII photochemistry, F_p/F_T ratio) under different conditions. The influence of leaf senescence, changes in intensity of excitation light, slight dehydration of plants and their recovery from water deficiency have been examined. The pattern of $T_{0.5}$ behavior, observed in laboratory experiments, and the results of its comparison with other indices of CFI give occasion to propose the usage of $T_{0.5}$ for indirect estimation of PSA activity when operational integrative monitoring of PSA state is required. Further studies are necessary for establishing quantitative relationships between PSA activity and fluorescence parameter $T_{0.5}$ under specific stress conditions.