

# Методи лабораторних і польових досліджень флуоресценції хлорофілу

Олександр В. ПОЛІЩУК

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України,  
вул. Терещенківська, 2, Київ 01004, Україна  
polishch@yandex.ru

Polishchuk O.V. **Methods in laboratory and field research of chlorophyll fluorescence.** Ukr. Bot. J., 2017, 74(1): 86–93.

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine  
2, Tereshchenkivska Str., Kyiv 01004, Ukraine

**Abstract.** Chlorophyll fluorescence analysis is one of the most popular techniques used in the laboratory and field study of plants. This brief review discusses basic methodological approaches and parameters in chlorophyll fluorescence studies and their use in basic and applied plant physiology research. Being principally non-intrusive, chlorophyll fluorescence analysis allows distant monitoring of intact plants' physiological state and early detection of stresses *in situ*.

**Keywords:** chlorophyll fluorescence, photosynthesis, PAM fluorescence, photosynthetic efficiency, remote sensing

## Вступ

Метод індукції флуоресценції хлорофілу (ФХ) є перспективним у моніторингу довкілля, оскільки вивчення кінетики флуоресценції може надати свідчення про характер активності зовнішнього середовища і вплив його на параметри фотосинтезу. Цю інформацію можна використати для екологічного моніторингу та оцінки стійкості фотосинтезуючих організмів (Lysenko et al., 2013).

Перші експерименти з вивчення ФХ пов'язані з іменем Д. Брестера, який ще в 1833 р. спостерігав червоне світіння листя *Laurus nobilis* L. під впливом синього світла. Термін "флуоресценція" був запропонований в 1852 р. Дж.Г. Стоксом, чий дослідження поклали початок інтенсивному вивченню цього феномену (Rabinowitch, Govindjee, 1969). Згідно до його теорії, флуоресценція являє собою випромінювання поглинутого речовиною світла зі зміщенням у червону область спектра (Strasser et al., 2000). Різниця між довжинами хвиль абсорбованого й повторно випромінюваного світла отримала назву зсуву Стокса.

В історії вивчення феномену флуоресценції виключно важливе значення мали спостереження Н.Дж. Мюллера (Muller, 1874), який показав, що величина інтенсивності флуоресценції хлорофілу,

який входить до складу організму, значно нижча ніж флуоресценція розчину хлорофілу відповідної концентрації. В подальшому ці спостереження стали основою в розумінні явища фотохімічного гасіння флуоресценції, коли збуджена молекула, переходячи до основного, незбудженого, стану, віддає частину своєї енергії для здійснення фотосинтетичних процесів (Lysenko et al., 2013).

Кінетику ФХ уперше було досліджено в роботі Х. Каутського та А. Хірша (Kautsky, Hirsch, 1931). Автори показали, що освітлення попередньо адаптованих до темряви рослин синім діючим світлом призводить до різкого зростання червоної флуоресценції хлорофілу в перші секунди з моменту його ввімкнення, після чого інтенсивність флуоресценції поступово знижується до деякого стаціонарного рівня. Описане явище отримало назву ефекту Каутського. Спостереження флуоресценції проводились авторами неозброєним оком, а результати викладені на одній сторінці тексту. Проте робота викликала великий інтерес, насамперед тому, що виявлена кінетика якісно співпадала з фотоіндукційними зміщеннями асиміляції CO<sub>2</sub>, раніше виявленим О. Варбургом (Warburg, 1920).

У процесі наступних досліджень ФХ зелених тканин висновок, що чим більша доля енергії фотонів може бути направлена на фотохімічні потреби, тим нижча інтенсивність флуоресценції, підтвердився,

ставши одним з основних елементів базової концепції фотосинтезу – нециклічного переносу електронів у тилакоїдах (Lysenko et al., 2013).

Ефективність фотосинтезу є одним з основних параметрів, за яким можна визначити, в якому стані знаходиться рослина. Цей параметр в об'єкта досліджень можна встановити за допомогою методу індукції ФХ, основні принципи якого наведені нижче (Korneev, 2002).

1. Існують три основні шляхи реалізації енергії квантів світла, поглинутих молекулами хлорофілу: фотохімічні реакції, тепла дисипація та флуоресценція.
2. Всі три процеси конкурентні між собою, так, зміна ефективності одного з них призводить до зворотної зміни двох інших. Тому інтенсивність флуоресценції чутлива до змін інтенсивності фотохімічних процесів і теплової дисипації.

Фотосинтез хлорофілу є показником, дуже чутливим до різних видів стресу на його ранніх стадіях, коли зовні на рослинах і навіть у їхніх спектрах поглинання й відбивання світла ще не виявляються зміни (Polishchuk et al., 2009; Vodka et al., 2013; Polishchuk et al., 2016). Вимірюючи варіабельну складову ФХ, можна отримати достовірну інформацію про відносно статичні, "паспортні" характеристики фотосинтетичного апарату (ФСА) рослин, зокрема оптимальна інтенсивність світла для ФСА рослин, яка є індикатором середньодобової освітленості території (Polishchuk, Voitsekhovich, 2014). Дослідження ФХ дає додаткову можливість оцінити вміст хлорофілу в фітоелементах, співвідношення фотосистеми 2 (ФС2) та фотосистеми 1 (ФС1), а також розмір світлозбиральної антени ФС2, який, в свою чергу, корелює зі співвідношенням хлорофілів *a* та *b*. Крім того, дослідження ФХ дає змогу визначити такі відносно динамічні параметри, як: квантовий вихід електронного транспорту в ФСА, фотохімічне гасіння флуоресценції, яке відображає окисненість пластохінонового пулу за рахунок доступності термінальних акцепторів електронів (НАДФ<sup>+</sup> і O<sub>2</sub>) і нефотохімічне гасіння флуоресценції, яке пов'язане з доступністю АДФ (Mokrosnop et al., 2015). Ці показники дозволяють аналізувати зміни в метаболізмі рослин, зумовлені змінами кількості, якості світла, а також змінами різних екологічних факторів, оскільки фотосинтетичний апарат динамічно модифікується для оптимального забезпечення метаболічних потреб рослини.

## Основні методичні підходи до вимірювання флуоресценції хлорофілу в лабораторії

### РАМ-флуоресценція

В лабораторних дослідженнях найбільш популярним методом є РАМ-флуоресценція (англ. Pulse Amplitude Modulation-fluorescence – імпульсно-модульована флуоресценція), або аналіз гасіння ФХ. В основі вимірювання лежить синхронна реєстрація високошвидкісного світлового сигналу, індукованого імпульсним джерелом світла (світлодіодом, імпульсним лазером, або надшвидким ксеноновим спалахом, тривалість якого становить 1–3 мкс максимум, фронт – 50 нс). Через велику скважність сигналу, його інтегральної потужності недостатньо для помітного відновлення переносників електронів у фотосинтетичному електрон-транспортному ланцюзі та для підтримання фотосинтезу. Головною перевагою методу є великий динамічний діапазон вимірювань світла й здатність вимірювати корисний сигнал на фоні шуму, що на 3–4 порядки перевищує корисний сигнал за амплітудою, тобто достовірно вимірювати сигнал флуоресценції на фоні потужного світла, що підтримує фотосинтез.

*Дослідження гасіння флуоресценції хлорофілу за допомогою модулюючого флуориметра "Хе-РАМ".* Прилад призначений для вимірювання основних параметрів методу – модулюючий флуориметр "ХЕ-РАМ" (Walz, Німеччина). Різниця в сигналі флуоресценції, що виникає в результаті спалаху вимірюючого світла, посилюється селективним підсилювачем (синхронний підсилювач, англ. lock-in amplifier).

Флуориметр "ХЕ-РАМ" має три джерела світла, які забезпечують три типи освітлення об'єкта:

**ML** (*measuring light*) – вимірююче світло. Слабке імпульсне світло, що не викликає фотохімічних реакцій (інтегральна щільність потоку фотонів за час імпульсу – 0,2–1 мкмоль фотонів м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>, тривалість імпульсів – 1–3 мкс, частота – від 1,6 до 600 кГц залежно від режиму запису й типу пристрою);

**AL** (*actinic light*) – діюче (актинічне) світло, яке підтримує фотосинтез;

**SP** (*saturation pulses*) – короткі спалахи насичуючого світла, інтенсивність якого достатня для швидкого відновлення пулу Q<sub>A</sub> (> 2000 мкмоль фотонів м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>, тривалість спалаху 0,8–2,0 с).

При запису індукційних кривих дотримуються наступного порядку вмикання-вимикання перелічених вище джерел світла. Вмикають джерело

вимірюючого світла (ML), в результаті чого флуоресценція досягає значення  $F_o$  (рис. 1). Інтенсивність ML настільки низька, що реакційні центри ФС2 (РЦ ФС2) залишаються "відкритими". Потім застосовують короткий спалах світла високої інтенсивності, при якому відновлюється  $Q_A$  всіх комплексів ФС2. Флуоресценція досягає максимального значення  $F_m$  (РЦ ФС2 – "зачинені"). За різницею між рівнями флуоресценції  $F_o$  та  $F_m$  оцінюють потенційну ефективність фотохімії ФС2 в адаптованому до темряви стані.

Після того, як ФХ релаксує до рівня  $F_o$  (за рахунок відтоку електронів від  $Q_A^-$  до пулу пластохінонів), вмикають діюче світло (AL), яке викликає зміни виходу флуоресценції. Інтенсивність флуоресценції на певний момент часу в ході індукції фотосинтезу позначають величиною  $F$ . Зниження рівня сигналу (гасіння флуоресценції) викликане окисненням  $Q_A^-$  в результаті активації реакцій темної фази фотосинтезу (фотохімічне гасіння флуоресценції) та збільшенням теплової дисипації в світлозбиральній антені ФС2 (нефотохімічне гасіння флуоресценції).

Для оцінки вкладу фотохімічних і нефотохімічних процесів необхідно виключити вплив одного з них. Як правило, це здійснюється по відношенню до фотохімічного компоненту шляхом швидкого відновлення первинних акцепторів ФС2,  $Q_A$  – за рахунок застосування коротких спалахів світла високої інтенсивності. В результаті спалаху насичуючого світла (SP) також відбувається відновлення всіх  $Q_A$  у зразку, що через нефотохімічне гасіння флуоресценції супроводжується збільшенням інтенсивності флуоресценції до рівня  $F'_m$ , помітно нижчого за  $F_m$ . Наявність фотохімічного гасіння обумовлює різницю між  $F'_m$  та  $F$  (рис. 1).

Після спалаху SP діюче світло (AL) вмикають. При цьому пул переносників електронів окиснюється. Рівень флуоресценції досягає значення  $F'_o$ . Знаючи величини  $F'_o$  і  $F'_m$ , можна визначити реальний квантовий вихід фотохімії ФС2 в адаптованому до світла стані (Polishchuk, Voitsekhovich, 2014).

У результаті отримують криві, загальний вигляд яких представлено на рис. 1. Числові значення параметрів флуоресценції отримують за допомогою програмного забезпечення "Graph", розробленого у відділі мембранології і фітохімії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, і розраховують за наступними формулами (Maxwell, Johnson, 2000; Rohacek, 2002):

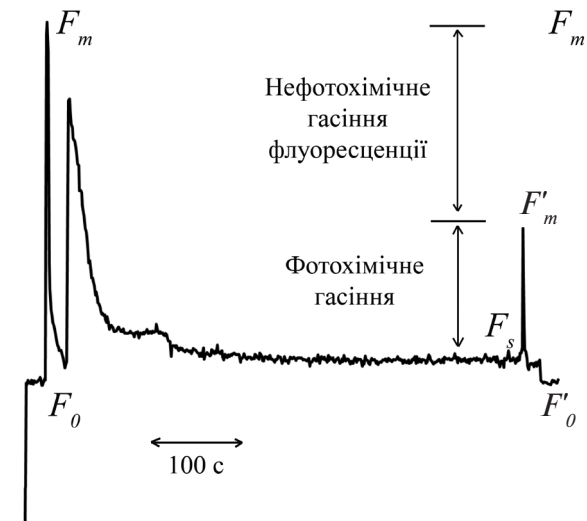


Рис. 1. Визначення параметрів фотохімічного й нефотохімічного гасіння флуоресценції хлорофілу:  $F_o$  – мінімальний рівень флуоресценції в темноадаптованому стані;  $F_m$  – максимальний рівень флуоресценції;  $F_s$  – стаціонарний рівень флуоресценції в світлоадаптованому стані;  $F'_m$  – максимальний рівень флуоресценції в світлоадаптованому стані;  $F'_o$  – мінімальний рівень флуоресценції у світлоадаптованому стані

Fig. 1. An example curve for determination of photochemical and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence:  $F_o$  – minimal fluorescence in dark-adapted state;  $F_m$  – maximal fluorescence;  $F_s$  – steady-state fluorescence in light-adapted state;  $F'_m$  – maximal fluorescence in light-adapted state;  $F'_o$  – minimal fluorescence in light-adapted state

Максимальний потенційний квантовий вихід варіабельної ФХ ( $F_v/F_m$ ):

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{(F_m - F_o)}{F_m}, \quad (1)$$

де  $F_m$  – максимальна флуоресценція;  $F_o$  – мінімальний (темновий) рівень флуоресценції.

Фотохімічне гасіння ФХ ( $qP$ ):

$$qP = \frac{(F'_m - F'_o)}{(F'_m - F'_o)}, \quad (2)$$

де  $F'_m$  – максимальна флуоресценція у адаптованому до світла стані;  $F'_o$  – мінімальна така;  $F'_i$  – поточний рівень флуоресценції.

Ефективний квантовий вихід ФС2 ( $\Phi_{PSII}$ ):

$$\hat{O}_{PSII} = \frac{(F'_m - F_t)}{F'_m}, \quad (3)$$

Нефотохімічне гасіння ФХ (NPQ):

$$NPQ = \frac{(F_m - F'_m)}{F'_m} \quad (4)$$

### Швидка кінетика індукції флуоресценції, ОЛР-метод флуоресценції

ОЛР-метод отримав назву за фазами зростання сигналу флуоресценції при індукції потужним джерелом світла 100–2000 мкмоль/(м<sup>2</sup>·с). Для її вимірювання вмикається діюче світло з відносно крутим фронтом (не більше 10 мкс) і починається реєстрація даних з високою швидкістю (не менше 100 кГц), або з високою часовою роздільною здатністю в певні моменти часу з початку освітлення (0,05; 0,1; 0,3; 2; 30 мс) до досягнення часової відмітки 1–2 с (Strasser et al., 2000).

Цей метод теж є досить інформативним, не залежить від окремого джерела освітлення, але не дозволяє вимірювати параметри фотосинтезу на світлі. Варіюючи інтенсивність діючого світла, можна отримати додаткову інформацію, аналогічну такій, що отримують за допомогою РАМ-флуоресценції. Переваги цього методу полягають у можливості робити висновки про стан донорного та акцепторного боків ФС2, які є основними мішенями дії іонів важких металів на фотосинтетичний апарат. Також показано зміни редокс-потенціалу первинного хінонового акцептора ФС2 при тепловому та інших видах стресу, що веде до пригнічення транспортування електронів на акцепторному боці ФС2 (Krieger et al., 1995). У цілому ОЛР-метод характеризується більшою зручністю як експрес-метод, але й більшою варіабельністю та меншою достовірністю результатів порівняно з РАМ-флуоресценцією.

### Релаксація флуоресценції хлорофілу *a*

Практично вся ФХ у хлоропластах походить з ФС2. У той же час, навіть у темноадаптованих хлоропластах частина молекул хлорофілу здатна до флуоресценції. Ці молекули вільні або перебувають у складі пошкоджених світлозбиральних хлорофіл-білкових комплексів. У зв'язку із цим як індикатор

співвідношення  $Q_A^-/Q_A$  використовують рівень варіабельної флуоресценції хлорофілу в препаратах хлоропластів (Mokrosnop et al., 2015).

В експериментальних дослідженнях для коректного порівняння різних варіантів та застосування статистичних методів обробки результатів варіабельну ФХ нормують на максимальний її рівень, який реєструється за дії потужного насичуючого світла до 5000 мкмоль квантів/(м<sup>2</sup>·с) протягом 500–1000 мс на темноадаптовані хлоропласти. В даній роботі нормований рівень варіабельної ФХ виражено формулою:

$$\frac{F_v(t)}{F_m} = \frac{F(t) - F_0}{F_m}, \quad (5)$$

де  $F(t)$  – рівень флуоресценції на момент часу  $t$ ,  $F_0$  – мінімальний рівень флуоресценції,  $F_m$  – максимальний її рівень. Нормований максимальний рівень варіабельної флуоресценції є загальноприйнятним показником ефективності, або квантового виходу, розділення зарядів у ФС2:

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_0}{F_m}. \quad (6)$$

Після відновлення практично всіх  $Q_A$  до  $Q_A^-$  однократним збудженням реакційного центру ФС2 коротким (< 50 мкс) інтенсивним спалахом світла, наступне окиснення  $Q_A^-$  супроводжується швидким спадом варіабельної флуоресценції за рахунок перенесення електронів від  $Q_A^-$  до  $Q_B$ . У випадку, коли тривалість спалаху перевищує 50 мкс, відбувається багатократне збудження ФС2. Відновлені молекули  $Q_B$  передають електрони в пул PQ. Тому ступінь відновленості  $Q_B$  залежить від редокс-стану цього пулу. Окиснення останнього залежить, у свою чергу, від лінійного транспортування електронів через ФС 1. Таким чином, кінетика реокиснення  $Q_A^-$ , виміряна за темновим спадом варіабельної флуоресценції хлорофілу, контролюється редокс-станом  $Q_B$  і пулу PQ (Bukhov et al., 2001).

Інакше спостерігається після тривалого спалаху світла, за якого елементарна подія розділу зарядів відбувається сотні разів – множинно-оборотного спалаху, тривалістю більше за 500 мс, коли пул PQ встигає відновитися, реокиснення  $Q_A^-$  контролюється змінами редокс-стану  $Q_B$  і PQ (Bukhov et al., 1992).

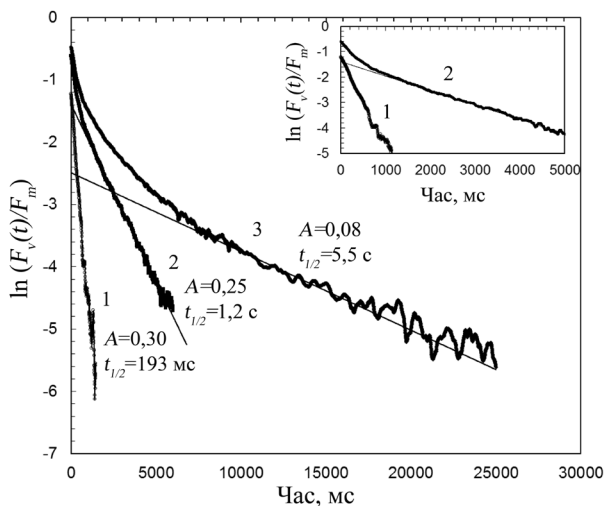


Рис. 2. Кінетичний аналіз темнового спаду  $\ln \left( \frac{F_v(t)}{F_m} \right)$  у суспензії хлоропластів у контролі: 1 – швидка, 2 – середня, 3 – повільна компоненти. Поряд із кривими наведено їхні кінетичні параметри. В правому верхньому кутку зображено швидку та середню компоненти у меншій часовій шкалі для більш адекватного їхнього порівняння. Вихідну криву отримано поточковим усередненням із 10 окремих препаратів

Fig. 2. Kinetic analysis of dark relaxation of  $\ln \left( \frac{F_v(t)}{F_m} \right)$  in chloroplast suspension in control: 1 – fast, 2 – medium and 3 – slow components. Along with curves, their kinetic parameters are shown. In the upper right corner, a rapid and secondary components in a smaller time scale are shown for more adequate comparisons. Initial curve was obtained by pointwise averaging of 10 individual

Електрони від  $Q_A^-$  переносяться двома основними шляхами: 1) у прямому напрямку, продовжуючи рух до кінцевого акцептора (метил віологен чи кисень); 2) у зворотному напрямку, забезпечуючи рекомбінацію  $Q_A^-$  і  $S_2$ -стану водоокиснюючого комплексу (Bukhov et al., 2001).

Залежно від "провідності" електронно-транспортного ланцюга (максимальної швидкості лімітуючої реакції) та доступності акцептора (Фд/НАДФ,  $O_2$ ), частка електронів, які рухаються за першим або другим напрямком, значно варіює.

Після дії множинно-оборотного спалаху спостерігається, як правило, три фази реокиснення  $Q_A^-$ , кожна з яких характеризується своїм відмінним часом напівспаду. Відносна амплітуда кожної з фаз

залежить не від початкового стану ФС2 (на момент вимкнення світла), як за умов дії короткого спалаху, а від: 1) здатності ФС 1 та, ймовірно, ФС2 передавати електрони на акцептор і 2) редокс-стану наступних за  $Q_B$  переносників зарядів.

Швидка фаза, яка триває декілька мілісекунд після вимкнення світла, прискорюється освітленням у далекому червоному діапазоні хвиль, яке поглинається переважно у ФС 1, а також високо-ефективним акцептором електронів з ФС 1 та ФС2 метилвіологеном (Bukhov et al., 1992, 2001).

Нами було проведено кінетичний аналіз темнового спаду флуоресценції в суспензії хлоропластів після спалаху світла (1000 мкмоль квантів/( $m^2 \cdot c$ ), 600 мс, діапазон 400–700 нм) (Polishchuk et al., 2009). На графіках темнового спаду в напівлогарифмічних координатах виявлялось три компоненти, яким властива кінетика першого порядку (рис. 2). Найбільшою за амплітудою в контролі була швидка компонента спаду флуоресценції ( $t_{1/2} = 193$  мс), яка становила більше 50% максимального квантового виходу варіабельної флуоресценції (рис. 2, крива 1). Середня компонента ( $t_{1/2} = 1222$  мс, рис. 3, крива 2) становила приблизно 40% і повільна ( $t_{1/2} = 5,5$  с, рис. 3, крива 3) – близько 10% (Polishchuk et al., 2009).

Швидка фаза релаксації флуоресценції найбільшою мірою пов'язана із лінійним перенесенням електронів від ФС2, а її зменшення й зповільнення є селективним індикатором утрудненого транспортування електронів на акцепторній стороні ФС2. Проміжна компонента теж відображає транспортування електронів на акцепторній стороні ФС2 і прискорюється при додаванні акцептора. Повільна фаза відображає повільну рекомбінацію зарядів у ФС2, швидкість якої може змінюватись залежно від конформаційного стану ФС2 (Bukhov et al., 1992). Існування трьох компонент спаду флуоресценції відображає гетерогенність ФС2, пов'язану, зокрема, із циклом пошкодження-репарації ФС2. У кожний момент часу певна частка реакційних центрів ФС2 знаходиться у повністю функціональному стані, деяка частина їх частково пошкоджена й транспортування електронів у них пригнічене, а решта реакційних центрів ФС2 настільки пошкоджена, що вони не здатні до перенесення електронів із первинного хінонового акцептора  $Q_A$  на вторинний акцептор  $Q_B$  на акцепторній стороні ФС2 і здатні лише забезпечувати зворотню рекомбінацію зарядів, що розділилися за дії світла.

Існує також багато методик, заснованих на вищезазначених принципах. Всі ці методи потребують високої світлочутливості й швидкості відгуку оптоелектронної частини в поєднанні з широким динамічним діапазоном. Тому в якості світлочутливого сенсора використовуються фотодіоди з великою площею та оптична система з максимально можливим пропусканням світла в єдиному широкому спектральному діапазоні 680–760 нм. Максимальної потужності флуоресценції досягають за допомогою потужного збуджуючого світла, в окремих випадках його вплив на рослину мінімальний за рахунок короткого тривалого імпульса. Оптичні шляхи мінімізуються або вводиться волоконна оптика. В окремих випадках флуорометр побудований на фотоелектронному помножувачі ("Phyto-PAM", Walz), а схема освітлення – таким чином, що на момент вимірювання флуоресценції діюче світло повністю вимикається на час від 1 до 10 мкс, при цьому слабке вимірююче світло вмикається.

### **Лабораторне дослідження впливу йонів важких металів на релаксацію флуоресценції хлорофілу $a$ за допомогою флуорометра "Хе-РАМ"**

Для дослідження впливу йонів важких металів використовували солі  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  та  $\text{HgCl}_2$ . У результаті додавання йонів  $\text{Cu}$  та  $\text{Zn}$  у концентрації 100 мМ до реакційного середовища суттєво змінюються характеристики всіх трьох компонент спадку флуоресценції: швидкої, середньої та повільної.

Хоча з літератури відомо лише про інгібіторну дію йонів важких металів на транспортування електронів на рівні ФС2, у нашій роботі було виявлено два принципово різних типи їхнього впливу. Більш електрон-негативні  $\text{Zn}^{2+}$  ( $E^0 = -0,76$  В),  $\text{Cd}^{2+}$  ( $E^0 = -0,403$  В) та  $\text{Pb}^{2+}$  ( $E^0 = -0,13$  В) інгібують транспортування електронів, а більш електрон-позитивні  $\text{Cu}^{2+}$  ( $E^0 = +0,153$  В) та  $\text{Hg}^{2+}$  ( $E^0 = +0,46$  В) проявляють стимулюючу дію (Polishchuk et al., 2009). Ми дотримуємося припущення, що останні можуть акцептувати електрони за умов пригнічення транспортування електронів між  $Q_A^-$  та  $Q_B$ . Крім того, встановлено, що двовалентні йони  $\text{Zn}$ ,  $\text{Cd}$ ,  $\text{Pb}$ ,  $\text{Cu}$  та  $\text{Hg}$  впливають на транспортування електронів саме на акцепторній стороні ФС2, що підтверджує наше припущення, засноване на екстраполяції з механізмів дії важких металів у реакційних центрах бактерій. Разом з тим, повного блокування першої та другої компонент спадку флуоресценції не відбувається, що, можливо, пов'язане з індукцією альтернативного транспортування електронів у ФС2.

## **Методи дистанційного вимірювання флуоресценції хлорофілу**

### **Технічні обмеження перенесення лабораторних методів в умови дистанційного вимірювання флуоресценції хлорофілу**

Лабораторні методи є активними, тобто передбачають використання потужного керованого джерела світла. Інтенсивність сигналу флуоресценції складає менше ніж 1% інтенсивності збуджуючого світла. Для вимірювання рівня  $F_0$  потрібна інтенсивність збуджуючого світла на рівні 0,1 мкмоль/( $\text{m}^2 \cdot \text{c}$ ), а інтенсивність флуоресценції на рівні хлоропластів становить менше 1 нмоль/( $\text{m}^2 \cdot \text{c}$ ), або приблизно 0,05 лк. З відстанню цей сигнал розсіюється і достовірно виміряти його стає неможливим. Для використання активних методів у дистанційному вимірюванні потрібні дуже потужні джерела світла й потужна оптика для колімації сигналу флуоресценції на відносно компактний сенсор. У зв'язку із цим більш популярними є пасивні методи, що передбачають використання сонячного світла в якості збуджуючого флуоресценцію. Вимірювання в основному відбувається у Фраунгоферових лініях – ділянках сонячного спектру, в яких сонячне світло практично не досягає земної поверхні.

### **Активний метод LIFT (Laser-induced fluorescence transient)**

Активні методи в дистанційному вимірюванні флуоресценції обмежено застосовуються у вигляді методу LIFT (Laser-induced fluorescence transient) (Pieruschka et al., 2012). Потужний імпульсний лазер збуджує флуоресценцію, а потужна оптика фокусує сигнал флуоресценції (інтегральна інтенсивність в діапазоні 680–750 нм) на фотоелектронному помножувачі, і швидка кінетика зростання флуоресценції фіксується з швидкістю не менше 1 мГц. При вимірюваннях у нічний час отримані результати є відносно відтворюваними і корелюють з лабораторними, отриманими методом ОЛР. У денний час також можливо вимірювати корисні показники, такі як ФХ стаціонарного стану.

### **Пасивний метод SIF (Solar-induced fluorescence)**

Метод SIF заснований на вимірюванні сигналу флуоресценції у Фраунгоферових лініях, що відповідають поглинанню кисня:  $\text{O}_2\text{-A} - 759,370$  нм і  $\text{O}_2\text{-B} - 686,719$  нм. Рівень сигналу ФХ при цьому не перевищує 1% від поглинутого світла, тому в таких вузьких спектральних ділянках майже неможливо виміряти швидкі кінетики та отримати динамічну інформацію про стан електрон-транспортного ланцюга. Також неможливо виміряти темновий рівень

**Орієнтовні технічні вимоги до флуорометрів**  
**Referential technical requirements to fluorimeters**

Параметр	Флуорометр		
	лабораторний	польовий	бортовий
Відстань до зразка	5–50 см	1–20 м	10–100 м
Діаметр вимірюваної ділянки	1–10 см	0,1–1,0 м	0,5–2,0 м
Потужність лазера для визначення максимального рівня флуоресценції при 660 нм	200 мВт	2–10 Вт	10–100 Вт
Спектральна роздільна здатність, нм	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05
Спектральний діапазон, нм	680–770	680–770	680–770
Час інтеграції сигналу, с	0,1–1,0	0,1–1,0	0,1–1,0
Мінімальна потужність світла на вході спектрометра, Вт	10 <sup>-13</sup>	10 <sup>-14</sup>	10 <sup>-15</sup>
Приклад існуючого спектрометра	"HR2000+" (Ocean Optics)	"HR2000+" (Ocean Optics)	спектрометри типу "Hyperspec® Chlorophyll Fluorescence Sensor" (Headwall photonics), налаштовані на діапазони 675–695 нм і 754–775 нм

флуоресценції, який добре корелює із вмістом хлорофілу. Можливо лише виміряти стаціонарний рівень ФХ за різних інтенсивностей освітлення. Для достатньої чутливості методу час інтеграції сигналу подовжують до десятків і сотень секунд, і отримують добре відтворювану інформацію про ФХ на двох довжинах хвиль. Оскільки в області 680 нм переважно спостерігається ФХ ФС2, а в області 740–760 нм – ФС 1, можна отримати корисну інформацію про стехіометричне співвідношення фотосистем. Крім того, мішенню дії важких металів є ФС2, зокрема її акцепторний бік, тому в присутності більшості важких металів у ґрунті співвідношення сигналу ФХ на цих довжинах хвиль ( $F_{685}/F_{760}$ ) суттєво спадає (Gouveia-Neto et al., 2012). Для надійного вимірювання ФХ за методом SIF необхідна спектральна роздільна здатність приладу не менше 0,05 нм у діапазонах 675–695 та 750–780 нм і надзвичайно висока чутливість (Meroni et al., 2009).

**Технічні вимоги до лабораторного, польового та бортового флуорометрів**

Основними вимогами є висока світлочутливість у діапазоні 680–770 нм, роздільна здатність не менше 0,05 нм. Для вимірювання квантового виходу ФС2 на відстані до 1 м необхідний червоний лазер потужністю 500 мВт, для більшої відстані, відповідно, більш потужний, який забезпечить освітлення вимірюваної ділянки на рівні 5000 мкмоль/(м<sup>2</sup>·с) протягом принаймні 1 с для досягнення рівня  $F_m$ . Перелік вимог до таких приладів, заснований на аналізі літературних джерел, наведено в таблиці.

Існують дистанційні дослідження, в яких метод SIF поєднують з використанням лазера, що дає можливість оцінити параметри процесу фотосинтезу в динаміці (Tubuxin et al., 2015), щоправда максимальна дистанція поки що обмежується по-

казником на рівні 5–10 см. Основними обмеженнями є потужність лазера для досягнення максимального рівня флуоресценції та світлочутливість спектрометричної частини.

Таким чином, для коректного проектування бортового приладу й порівняння лабораторних і дистанційних даних лабораторний варіант флуорометру за спектральними і часовими характеристиками має бути не гірший за інші.

**СПИСОК ПОСИЛАНЬ**

- Bukhov N.G., Egorova E., Krendeleva T. Relaxation of variable chlorophyll fluorescence after illumination of dark-adapted barley leaves as influenced by the redox states of electron carriers. *Photosynth. Res.*, 2001, 70: 155–166.
- Bukhov N.G., Mohanty P., Rakhimberdieva M.G., Karapetyan N.V. Analysis of dark-relaxation kinetics of variable fluorescence in intact leaves. *Planta*, 1992, 187: 122–127.
- Gouveia-Neto A.S., Silva E.A., da Silva A.J., do Nascimento C.W.A. Heavy metal stress detection and monitoring via LED-induced chlorophyll fluorescence analysis of *Zea mays* L. seedlings aimed at polluted soil phytoremediation. In: *Proc. SPIE 8225, Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues X*, available at: <http://spie.org/822505> (accessed 9 February 2012).
- Kautsky H., Hirsch A. Neue Versuche zur Kohlensäure-assimilation, *Naturwissenschaften*, 1931, 119: 964–964.
- Korneev D.Yu. *Informatsyonnye vozmozhnosti metoda induktsyi fluorestsentsyi khlorofilla*, Kiev: Alterpress, 2002, 188 pp. [Корнеев Д.Ю. *Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла*, Киев: Альтерпрес, 2002, 188 с.].
- Krieger A., Rutherford A.W., Johnson G.N. On the determination of redox midpoint potential of the primary quinone electron acceptor,  $Q_A$ , in Photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1229: 193–201.
- Lysenko V.S., Varduny T.V., Soyev V.H., Krasnov V.P. *Fundamentalnye issledovaniya*, 2013, 4(1): 112–120.

- [Лысенко В.С., Вардуни Т.В., Соьер В.Г., Краснов В.П. Флуоресценция хлорофилла растений как показатель экологического стресса: теоретические основы применения метода. *Фундам. исследования*, 2013, 4(1): 112–120].
- Maxwell K., Johnson G.N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.*, 2000, 51(345): 659–668.
- Meroni M., Rossini M., Guanter L., Alonso L., Rascher U., Colombo R., Moreno J. Remote sensing of solar-induced chlorophyll fluorescence: Review of methods and applications. *Remote Sens. Environ.*, 2009, 113(10): 2037–2051.
- Mokrosnop V.M., Polishchuk O.V., Zolotareva O.K. *Dopovidi NAN Ukrainy*, 2015, 10: 77–84. [Мокросноп В.М., Полищук О.В., Золотарьова О.К. Функциональный стан фотосинтетического аппарата клітин *Euglena gracilis* при міксотрофному культивуванні. *Доп. НАН України*, 2015, 10: 77–84].
- Muller N.J.C. Beziehungen zwischen Assimilation, Absorption und Fluoreszenz im Chlorophyll des lebenden Blattes. *Jahrbücher für Wissenschaftliche Botanik*, 1874, 9: 42–49.
- Pieruschka R., Klimov D., Berry J.A., Osmond C.B., Rascher U., Kolber Z.S. Remote chlorophyll fluorescence measurements with the laser-induced fluorescence transient approach. *Meth. Mol. Biol.*, 2012, 918: 51–59.
- Polishchuk A.V., Topchiy N.N., Sytnyk K.M. *Dopovidi NAN Ukrainy*, 2009, 6: 203–209. [Полищук А.В., Топчий Н.Н., Сытник К.М. Влияние ионов тяжелых металлов на перенос электронов на акцепторной стороне фотосистемы II. *Доп. НАН України*, 2009, 6: 203–209].
- Polishchuk A.V., Voitsekhovich A.A. Photosynthetic Properties of Some Free-Living and Lichenized Green Terrestrial Algae. *Int. J. Algae*, 2014, 4: 369–376.
- Polishchuk O.V., Vodka M.V., Belyavskaya N.A., Khomochkin A.P., Zolotareva E.K. The Effect of Acid Rain on Ultrastructure and Functional Parameters of Photosynthetic Apparatus in Pea Leaves. *Cell and Tissue Biology*, 2016, 10(3): 250–257.
- Rabinowitch E., Govindjee. *Photosynthesis*, New York: John Wiley & Sons Inc., 1969, 263 pp.
- Rohacek K. Chlorophyll Fluorescence Parameters: The Definitions, Photosynthetic Meaning, and Mutual Relationships. *Photosynthetica*, 2002, 40(1): 13–29.
- Strasser R.J., Srivastava A., Tsimilli-Michael M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*. Eds P. Mohanty, M. Yunus, U. Pathre, London: Taylor and Francis, 2000, pp. 443–480.
- Tubuxin B., Rahimzadeh-Bajgiran P., Ginnan Yu., Hosoi F., Omasa K. Estimating chlorophyll content and photochemical yield of photosystem II ( $\Phi_{PSII}$ ) using solar-induced chlorophyll fluorescence measurements at different growing stages of attached leaves, *J. Exp. Bot.*, 2015, 66(18): 5595–5603.
- Vodka M.V., Polishchuk A.V., Belyavskaya N.A., Zolotareva E.K. *Visnyk Kharkivskoho nats. ahrar. un-tu*, Ser. Biol., 2013, 3: 46–55. [Водка М.В., Полищук А.В., Белявская Н.А., Золотарёва Е.К. Действие тяжелых металлов на фотосинтетический аппарат и активность карбоангидразы хлоропластов гороха. *Вісн. Харк. нац. аграр. ун-ту*, Сер. Біол., 2013, 3: 46–55].
- Warburg O. Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlensäurezerersetzung in lebenden Zellen. II. *Biochem. Zeitschr.*, 1920, 103: 188–366.

Рекомендує до друку  
О.К. Золотарьова

Надійшла 27.04.2016

Полищук О.В. **Методи лабораторних і польових досліджень флуоресценції хлорофілу.** Укр. бот. журн., 2017, 74(1): 86–93.

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України  
вул. Терещенківська, 2, Київ 01004, Україна

Аналіз флуоресценції хлорофілу є одним з найбільш популярних методів, що застосовуються в лабораторних і польових дослідженнях рослин. Обговорюються основні методологічні підходи та параметри, які використовують в дослідженнях флуоресценції хлорофілу, а також їхнє застосування у фундаментальних і прикладних дослідженнях з фізіології рослин. Будучи принципово неінвазивним, аналіз флуоресценції хлорофілу дозволяє проводити дистанційний моніторинг фізіологічного стану інтактних рослин та раннє виявлення стресового стану за умов *in situ*.

**Ключові слова:** флуоресценція хлорофілу, фотосинтез, РАМ-флуоресценція, ефективність фотосинтезу, дистанційне зондування

Полищук А.В. **Методы лабораторных и полевых исследований флуоресценции хлорофилла.** Укр. бот. журн., 2017, 74(1): 86–93.

Інститут ботаники ім. Н.Г. Холодного НАН України  
ул. Терещенковская, 2, Киев 01004, Украина

Анализ флуоресценции хлорофилла является одним из самых популярных методов, применяемых в лабораторных и полевых исследованиях растений. Обсуждаются основные методологические подходы и параметры, используемые в исследованиях флуоресценции хлорофилла, а также их применение в фундаментальных и прикладных исследованиях физиологии растений. Будучи принципиально неинвазивным, анализ флуоресценции хлорофилла позволяет проводить дистанционный мониторинг физиологического состояния интактных растений и раннее выявление стрессового состояния в условиях *in situ*.

**Ключевые слова:** флуоресценция хлорофилла, фотосинтез, РАМ-флуоресценция, эффективность фотосинтеза, дистанционное зондирование