

ЭКОЛОГИЯ

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ФОТОСИНТЕЗА ЛИШАЙНИКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА

Д.Н. Маторин¹, А.А. Алексеев¹, С.Н. Горячев¹,
Л.Б. Братковская¹, В.С. Орлова²

¹Биологический факультет
МГУ им. М.В. Ломоносова
Ленинские горы, 1, корп. 42, Москва, Россия, 119992

²Экологический факультет
Российский университет дружбы народов
Подольское шоссе, 8/5, Москва, Россия, 113093

В статье представлены результаты изучения изменений параметров флуоресценции фотосинтетического аппарата лишайников под влиянием загрязнений и высушивания. Предполагается, что использование характеристик флуоресценции для оценки состояния лишайника может быть применено при биомониторинге.

Ключевые слова: лишайники, флуоресценция хлорофилла, фотосинтез, экология.

Введение. Известно, что ареал обитания лишайников чрезвычайно широк, так как они могут существовать в экстремальных условиях, непригодных для большинства других фотосинтезирующих организмов [3]. Лишайники переносят широкий диапазон температур, изменение влажности, освещенности, минерального разнообразия почвы, а также резкие колебания этих параметров. В то же время они крайне чувствительны к загрязнению среды: при небольшом повышении уровня содержания загрязнителей лишайники перестают расти на этой территории. Все это делает лишайники перспективным объектом для проведения биоиндикации окружающей среды [1; 4; 5]. Однако широкому использованию таких методов мешает недостаточная изученность механизмов процессов, происходящих в лишайнике при изменении внешних условий. Можно предположить, что защитные механизмы, обеспечивающие лишайникам феноменальную выносливость, являются и мишенью для воздействия загрязнителей.

Лишайники являются своеобразной группой. Тело их построено из двух различных организмов: гетеротрофного гриба и автотрофной водоросли, находящихся

ся в симбиотических отношениях. В слоевищах лишайников на долю водоросли приходится до 10% массы. Процесс фотосинтеза обеспечивает возможность питания как водоросли, так и гриба. Фотосинтез в перерасчете на содержание хлорофилла у лишайников немного ниже, чем у высших растений или свободноживущей водоросли. Именно этой особенностью прежде всего объясняется медленный рост лишайников.

Кроме того, лишайники большую часть своей вегетации находятся в высохшем состоянии, когда обменные процессы крайне подавлены. Необходимым условием для фотосинтеза является достаточная обеспеченность водой. Поскольку у лишайников отсутствуют всасывающая и проводящая системы, воду они впитывают всей поверхностью своего тела во время дождя, тумана, росы, причем в очень больших количествах (от 100 до 300% сухой массы слоевища). Однако эта влага быстро теряется. Находящиеся на солнце лишайники в течение часа полностью теряют поглощенную ими воду, и их влажность снижается до 2—15% сухой массы, что ниже необходимого минимума для фотосинтеза. Таким образом, период активной фотосинтетической деятельности у лишайников очень ограничен, если учесть комплексное воздействие факторов внешней среды на процесс фотосинтеза. В работах [2] методом регистрации замедленной флуоресценции (ЗФ) и ЯМР изучено влияние высушивания на фотосинтез лишайников высокогорных пустынь Восточного Памира, адаптированных к экстремальным по влажности условиям. ЗФ отражает количество активных реакционных центров ФС2 и энергизацию мембран [6]. В природных условиях Восточного Памира образцы лишайников, отобранные с открытого воздуха, обладали низким по интенсивности сигналом ЗФ, а в лишайниках, хорошо увлажненных снегом, наблюдается возрастание интенсивности ЗФ и соответственно фотосинтеза. Показана корреляция между сохранением подвижной воды и восстановлением активности у лишайников после глубокого высушивания.

Между тем работ по исследованию функционирования световых реакций фотосинтеза у лишайников крайне мало.

В настоящей работе были изучены особенности работы фотосинтеза водорослей лишайников на уровне фотосистемы 1 и 2, при действии высушивания и некоторых загрязнений с использованием современных флуоресцентных методов.

Материалы и методы исследования. Объектами исследований служили пять видов лишайников, характерных для окрестностей Московской области: *Hypogymnia physodes*, *Parmelia sulcata*, *Xanthoria parietina*, *Physcia sp.* и *Peltigera sp.* Последний является трехкомпонентной системой: наряду с основным фотобионтом *Dactyloccus* в данном лишайнике присутствуют и цианобактерии рода *Nostoc*. Остальные выбранные лишайники в качестве фотосинтезирующей компоненты содержат только зеленые водоросли, преимущественно из рода *Trebouxia* (у *H. physodes* — зеленые хлорококковые водоросли).

Измерения флуоресцентных показателей проводили также на приборе М-РЕА2 (HansaTech, Англия) [7]. Этот прибор позволяет проводить одновременную регистрацию индукции быстрой и замедленной флуоресценции, а также изменение Р700

по поглощению при длине 820 нм. Прибор измеряет индукционные кинетики с высоким временным разрешением (начиная с 0,01 мс). Регистрация быстрой и замедленной флуоресценции производится при чередовании актиничного света (627 нм, 5000 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) и темновых интервалов. Измерения проводили на интактных образцах лишайников с помощью специальной клипсы со световодами, которая крепилась на лишайнике. Регистрировали также максимальный квантовый выход флуоресценции F_v/F_m , отражающий интактность реакционных центров фотосистемы 2 (ФС2).

Все измерения проводились 5 раз. На рисунке приведены результаты характерных опытов, повторяющихся не менее 3 раз.

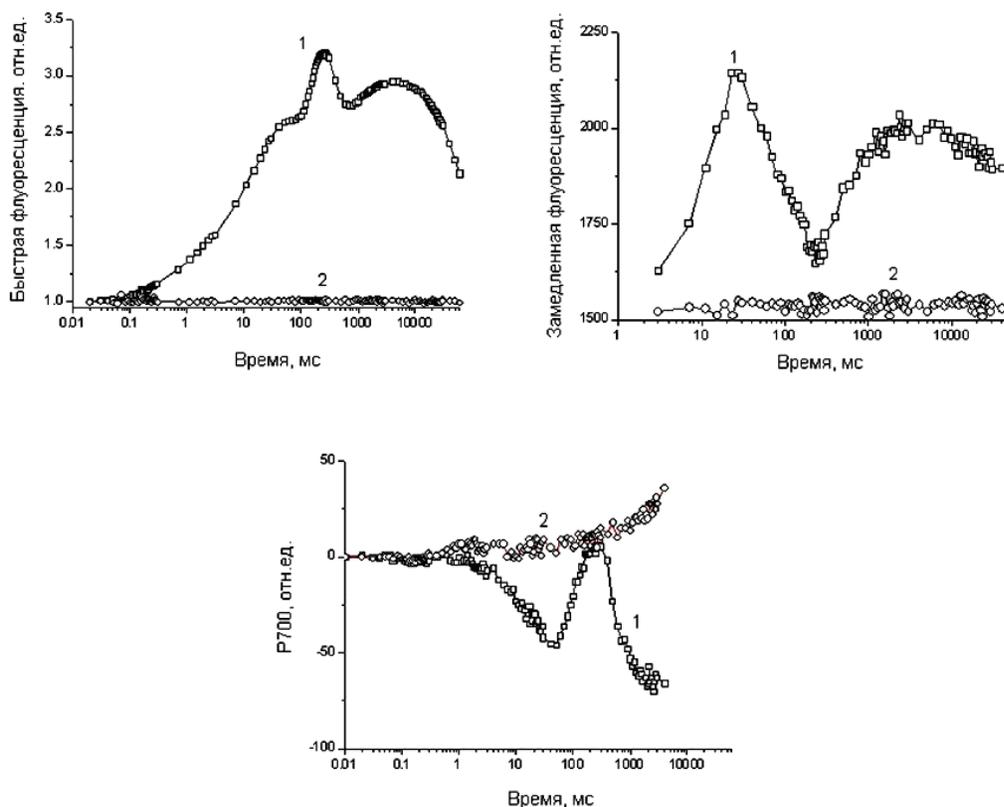


Рис. Индукционные кривые быстрой и замедленной флуоресценции хлорофилла и изменение поглощение при длине волны 820 нм, отражающее изменения пигмента ФС1- P_{700} после включения освещения на образцах влажных (1) и подсушенных (2) лишайников, адаптированных в течение 1 часа в темноте. Интенсивность подсветки 1200 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$. Одновременные измерения всех параметров на приборе M-PEA2

Результаты и их обсуждение. Измерение соотношения интенсивности флуоресценции хлорофилла при насыщающем фотосинтез возбуждающем свете (F_m) и условиях, не вызывающих изменений состояния фотосинтетического аппарата (F_o), позволяет определить максимальную эффективность первичных процессов фотосистемы 2, которая равна $(F_m - F_o)/F_m = F_v/F_m$. Эффективность первичных

процессов фотосинтеза (Fv/Fm) представляет собой безразмерную энергетическую характеристику фотосинтеза, аналогичную коэффициенту полезного действия и не зависящую от видовой специфики организма. Фотосистема 2 зеленых растений и водорослей связана с разложением воды и выделением кислорода при фотосинтезе. Исследования параметров флуоресценции показало, что в сухих лишайниках фотохимическая активность ФС2 фактически отсутствовала ($Fv/Fm = 0$). Образцы лишайников на сутки помещались в эксикатор, высушивалась в темноте.

После помещения сухого таллома во влажный воздух в первые 10—30 минут происходит увеличение интенсивности флуоресценции хлорофилла, однако значение параметра Fv/Fm при этом сохраняется низким. Далее рост Fm начинает опережать рост F_0 , а значение Fv/Fm возрастает от 0 до 0,6, что говорит о восстановлении фотохимической активности ФС2.

Для получения кинетик световой индукции флуоресценции с высоким временным разрешением был использован современный прибор МРЕА-флуорометр. В кинетике индукции флуоресценции ХЛ в ответ на свет высокой интенсивности обычно наблюдается несколько компонент, так называемые *O-J-I-P* переходы [7]. Они связаны с поступательным восстановлением акцепторов ФС2 и снижением фотохимического тушения и развитием нефотохимического тушения флуоресценции в ФС2. Фаза *O-J* обусловлена светоиндуцированным восстановлением Q_A , тогда как фаза *J-I-P* отражает, главным образом, дальнейшее накопление восстановленного Q_A^- , обусловленное снижением его реокисления в результате восстановления Q_B и пула хинонов. Уровни *O* и *P* на кинетической кривой соответствуют величине F_0 и Fm .

На рисунке приведены кинетические кривые индукции флуоресценции, нормированные по уровню *O*. В увлажненном лишайнике форма кривой близка к описанной в литературе. Это показывает, что нет существенных различий в функционировании фотосинтетических процессов у симбиотических и свободноживущих микроводорослей. В то же время при регистрации на флуориметре сухих образцов лишайников наблюдалась отсутствие индукции быстрой флуоресценции, что указывает на ингибирование вклада фотохимической фазы *J-I-P* и свидетельствует о нарушении фотосинтетического потока электронов.

Миллисекундная ЗФ возникает в результате вторичной реакции рекомбинации и зависит от величины электрохимического градиента протонов на тилакоидной мембране, энергия которого снижает энергию активации реакции рекомбинации [6]. При регистрации на флуориметре М-РЕА2 сухих образцов лишайников наблюдалась низкая интенсивность замедленной флуоресценции, которая свидетельствует об ингибировании энергизационных процессов на тилакоидной мембране у сухих лишайниках. В сухих образцах лишайников также не наблюдались окислительно-восстановительные процессы в фотосистеме 1 по изменениям пигмента реакционного центра P_{700} .

Лишайники являются признанными индикаторами химического загрязнения воздушной среды [1; 4; 5]. Обладая высокой чувствительностью ко многим из из-

вестных загрязнителей, они своим исчезновением сигнализируют об экологическом неблагополучии среды обитания. Поэтому в качестве традиционного методического подхода при проведении лишайноиндикационного обследования местности чаще всего используются показатели видового состава произрастающих лишайников и их обилия. Вместе с тем наряду с традиционным приемом лишайноиндикации чистоты воздушной среды показана возможность применения ее так называемого трансплантационного варианта. Он состоит в том, что слоевища одного или нескольких видов лишайников вместе с субстратом вносятся (трансплантируются) на некоторое время в районы обследования. После требуемой экспозиции проводится оценка воздействия загрязнителей на трансплантаты каким-либо из методов. С этой целью измеряются скорости фотосинтеза, дыхания, содержания хлорофилла, а также другие морфологические и физиологические показатели. В последнее время для оценки воздействия техногенного загрязнения атмосферы на лишайники начали использовать методы замедленной флуоресценции хлорофилла [1].

В табл. 1 представлены показатели выхода фотосинтеза для нативных образцов и образцов, подвергавшихся действию диурона (10^{-5} М) и CuSO_4 (10^{-5} М). Этот опыт имитировал токсическое воздействие загрязнителей: специфического (диурон) и несистемного (сульфат меди). Данные свидетельствуют, что при воздействии диурона эффективность фотосинтеза у лишайников уменьшилась почти в два раза. При загрязнении CuSO_4 почти у всех лишайников также наблюдалось резкое падение эффективности фотосинтеза, хотя чувствительность разных видов лишайников была различна.

Таблица 1

Изменение активности фотосинтеза по F_v/F_m у различных видов лишайников при воздействии диурона и CuSO_4

Вид лишайника	F_v/F_m		
	Нативный влажный образец	В присутствии диурона	В присутствии CuSO_4
<i>Hypogymnia physodes</i>	0,66	0,4	0,08
<i>Parmelia sulcata</i>	0,65	0,35	0,34
<i>Xanthoria parietina</i>	0,63	0,41	0,32

В табл. 2 представлены показатели выхода фотосинтеза для *H. physodes* и *P. sulcata*, подвергавшихся воздействию выхлопных газов автомобиля жигули. При этом часть образцов была подвергнута этому воздействию в сухом состоянии, а часть — в увлажненном. Сухие образцы затем подвергались гидратации. В результате у образцов, подвергнутых воздействию выхлопных газов во влажном состоянии, очень резко упал выход фотосинтеза, а в случае *H. physodes* лишайник вообще перестал фотосинтезировать. Напротив, после обработки газами сухих лишайников и последующем увлажнении наблюдался достаточно высокий выход F_v/F_m . Это показывает, что в подсушенном состоянии лишайники мало чувствительны к газовым загрязнениям.

Изменение активности фотосинтеза по *Fv/Fm* у *H. physodes* и *P. sulcata* при воздействии выхлопных газов на влажные и сухие образцы

Вид лишайника	<i>Fv/Fm</i>			
	Нативный влажный образец	После обработки выхлопными газами		
		обработанный влажный образец	обработанный сухой образец	обработанный сухой после 10 мин. увлажнения
<i>Hypogymnia physodes</i>	0,63	0	0	0,32
<i>Parmelia sulcata</i>	0,63	0,11	0,03	0,61

Устойчивость лишайников в сухом состоянии к факторам среды может быть объяснена их внутренним строением. В сухом состоянии гифы грибной компоненты возможно более плотно сомкнуты и не дают токсикантам достигнуть водорослей. Скорее всего, при увлажнении гриб перестает защищать водоросли, а значит, и фотосинтетический аппарат от воздействия загрязнителей, многие из которых к тому же хорошо растворимы в воде. Также необходимо отметить, что при увлажнении фотосинтетический аппарат активен и, как следствие, более уязвим.

Таким образом, флуоресцентные исследования на нативных лишайниках показали, что во влажном состоянии водоросли лишайника достаточно активны и имеют характеристики флуоресценции хлорофилла сходные со свободноживущими водорослями. При подсушивании происходит отключение фотосинтеза и ингибирование фотохимической фазы индукции флуоресценции. В этом состоянии лишайники более устойчивы к факторам среды и к действию газовых загрязнений. Использование характеристик флуоресценции хлорофилла может быть применено при биомониторинге для слежения за состоянием лишайника в режиме реального времени.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Григорьев Ю.С., Бучельников М.А. Трансплантационная лишайноиндикация загрязнения воздушной среды на основе замедленной флуоресценции хлорофилла // Экология. — 1997. — № 6. — С. 465—467.
- [2] Николаев Г.М., Маторин Д.Н., Аксенов С.И. Состояние воды и функционирование первичных реакций фотосинтеза у лишайника *Placoleconora melanophthalma* из холодных пустынь Восточного Памира // Научные доклады высшей школы. Биологические науки. — 1977. — № 1. — С. 101—106.
- [3] Трасс Х.Х. Трансплантационные методы лишайноиндикации // Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем. — Л.: Гидрометеиздат, 1985. — Т. 8. — С. 140—144.
- [4] Шапиро И.А. Физиолого-биохимические изменения у лишайников под влиянием атмосферного загрязнения // Успехи современной биологии. — 1996. — Т. 116. — № 2. — С. 158—172.
- [5] Eversman S., Sigal L.L. Effect of SO₂, O₃, and SO₂ and O₃ in combination on photosynthesis and ultrastructure of two lichen species // Can. J. Bot. — 1987. — V. 65. — P. 1806—1818.
- [6] Vasil'ev I.R., Matorin D.N., Lyadsky V.V., Venediktov P.S. Multiple action sites for photosystem II herbicides as revealed by delayed fluorescence // Photosynth. Res. — 1988. — V. 15. — N 1. — P. 33—39.

- [7] *Bulychev A.A., Osipov V.A., Matorin D.N., Vredenberg W.J.* Effects of far-red light on fluorescence induction in infiltrated pea leaves under diminished ΔpH and $\Delta \varphi$ components of the proton motive force // *J. Bioenerg. Biomembr.* — 2013. — V. 45. — N 1. — P. 37—45.

LITERATURA

- [1] *Grigor'ev Yu.S., Buchel'nikov M.A.* Transplantacionnaya lixenoindikaciya zagryazneniya vozduшной среды на основе замедленной флуоресценции хлорофилла // *Экология.* — 1997. — № 6. — S. 465—467.
- [2] *Nikolaev G.M., Matorin D.N., Aksenov S.I.* Sostoyanie vody i funkcionirovanie pervichnyx reakcij fotosinteza u лишайника *Placoleconora melanophthalma* из холодных пустынь Восточного Памира // *Nauch. dokl. vysshej shkoly. Biol. Nauki.* — 1977. — № 1. — S. 101—106.
- [3] *Trass X.X.* Transplantacionnyye metody lixenoindikacii // *Problemy e'kologicheskogo monitoringa i modelirovaniya e'kosistem.* — L.: Gidrometeoizdat, 1985. — T. 8. — S. 140—144.
- [4] *Shapiro I.A.* Fiziologo-bioximicheskie izmeneniya u лишайников под влиянием атмосферного загрязneniya // *Uspexi sovremennoj biologii.* — 1996. — T. 116. — № 2. — S. 158—172.
- [5] *Eversman S., Sigal L.L.* Effect of SO_2 , O_3 , and SO_2 and O_3 in combination on photosynthesis and ultrastructure of two lichen species // *Can. J. Bot.* — 1987. — V. 65. — P. 1806—1818.
- [6] *Vasil'ev I.R., Matorin D.N., Lyadsky V.V., Venediktov P.S.* Multiple action sites for photosystem II herbicides as revealed by delayed fluorescence // *Photosynth. Res.* — 1988. — V. 15. — N 1. — P. 33—39.
- [7] *Bulychev A.A., Osipov V.A., Matorin D.N., Vredenberg W.J.* Effects of far-red light on fluorescence induction in infiltrated pea leaves under diminished ΔpH and $\Delta \varphi$ components of the proton motive force // *J. Bioenerg. Biomembr.* — 2013. — V. 45. — N 1. — P. 37—45.

STUDY OF THE PROPERTIES OF LICHEN PHOTOSYNTHESIS USING CHLOROPHYLL FLUORESCENCE TECHNIQUES

**D.N. Matorin¹, A.A. Alekseev¹, S.N. Goryachev¹,
L.B. Bratkovskaja¹, V.S. Orlova²**

¹Faculty of Biology
Lomonosov Moscow State University
Lenin Hills, 1, korp. 42, Moscow, Russia, 119992

²Ecological Faculty
Peoples' Friendship University of Russia
Podolskoye shosse, 8/5, Moscow, Russia, 113093

Changes in the fluorescence parameters of the photosynthetic apparatus of lichens, induced by pollutants and drying, were studied. We suppose that fluorescence can be used for biomonitoring to assess the state of lichens.

Key words: lichen species, fluorescence, chlorophyll, photosynthesis, ecology.