

**ФОТОСИНТЕЗА ПРИ *H. annuus* (2n=34) x *Carduus acanthoides* (2n=22).
ПАРАМЕТРИ НА ХЛОРОФИЛНАТА ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ
И КОНЦЕНТРАЦИЯТА НА ПЛАСТИДНИТЕ ПИГМЕНТИ**

Мирослава Христова-Чербаджи

Институт по генетика "Академик Дончо Костов" - БАН, София

Резюме

*Христова-Чербаджи, М., 2004. Фотосинтеза при *H. annuus* (2n=34) x *Carduus acanthoides* (2n=22). Параметри на хлорофилната флуоресценция и концентрацията на пластидните пигменти.*

Изследвано е състоянието и функционалната активност на фотосинтетичния апарат чрез количествено определяне на хлорофилната флуоресценция и съдържанието на пластидните пигменти на *Helianthus annuus*, *Carduus acanthoides* и техния F₁-хибрид, където се очакваха нарушения във фотосинтетичния апарат. Нивата на хлорофилната флуоресценция са измерени на полето при две различни температури. При сравнение на трите образеца резултатите за различните параметри са с приблизително еднакви стойности. Получените резултати за хибрида *H. annuus* x *C. acanthoides* и неговия културен родител при две различни температури сочат увеличение на стойностите за F₀ и q₀ и понижение на стойностите за F_m, F_v, F_v/F_m и F_m/F₀. Не са отчетени нарушения в състоянието и функционалната активност на фотосинтетичния апарат при междуродовия хибрид *H. annuus* x *Carduus acanthoides*. Образците на родителските форми и хибрида използват светлината с еднаква ефективност. Резултатите за различните параметри при трите изследвани линии са близки. Стойностите на концентрацията на пластидните пигменти и съотношенията между хлорофил "a" и хлорофил "b" и между хлорофили и каротиноиди са близки. Това показва сходство в начина на реагиране при изследваните образци, независимо от това, че са представители на различни родове.

Ключови думи: *Helianthus annuus*, *Carduus acanthoides*, Хлорофилна флуоресценция, Съдържание пигменти

Abstract

*Hristova-Cherbadgi, M., 2004. Photosynthesis in *Helianthus annuus* (2n=34) x *Carduus acanthoides* (2n=22). Parameters of chlorophyll fluorescence and plastid pigments concentration.*

The condition and the functional activity of photosynthetic apparatus was studied by quantitative determination of chlorophyll fluorescence and pigments content of *Helianthus annuus*, *Carduus acanthoides* and their F₁-hybrid, where the breach of photosynthetic apparatus was awaited. The degrees of chlorophyll fluorescence were

measured in the field at two different temperatures. Comparing these three accessions, the results of the different parameters were similar. The obtained results for the hybrid *H. annuus* x *C. acanthoides* and its cultivated parent at two different temperatures showed increasing of values for F_0 and q_Q and decreasing of values for F_m , F_v , F_v/F_m and F_m/F_0 . Breach of photosynthetic apparatus for hybrid *H. annuus* x *Carduus acanthoides* was not registered. The parents and F_1 -hybrid were with similar effectiveness to sunlight utilization. The results of the different parameters were similar for the investigated lines. The pigments concentration values and ratio of chlorophyll "a" and chlorophyll "b" and between chlorophylls and carotenoids were similar. This showed identity in the response of the studied accessions, regardless of the fact that they were representatives of different genera.

Key words: *Helianthus annuus*, *Carduus acanthoides*, Chlorophyll fluorescence, Content pigments

УВОД

Температурната чувствителност на фотосинтезата при слънчогледа е била предмет на редица изследвания /Horie, 1977; Warren Wilson, 1966; Skoric et al., 1989; Paul et al., 1990/, които определят оптималните ѝ граници приблизително между 17 и 32°C.

Промените в скоростта на фотосинтезата води до промени във флуоресцентната емисия. Следователно измерването на хлорофилната флуоресценция и топлинната емисия индиректно потвърждава информацията за електрон-трансферната активност на хлоропластната мембрана. Повреда в електронната транспортна система води до съществени изменения в характеристиките на тези биофизични сигнали.

Малко са методите, чрез които може да се регистрира стресовото състояние при растенията поради особена чувствителност на фотосинтетичния апарат. Най-съвременен е методът на хлорофилната флуоресценция. Освен това като метод за стресова индикация се сочат промените в съдържанието на хлорофили и каротиноиди и съотношението между тях /Керин и др., 1997; Йорданов и др., 1984/.

In vivo хлорофилната флуоресценция може лесно и бързо да се измери върху листа с флуориметър. Измерването ѝ е много подходящ, недеструктивен метод за ранно определяне на понижен капацитет на фотосинтезата. Хлорофилно-флуоресцентният метод е използван за количествено определяне на неблагоприятните ефекти от водния дефицит, високата температура и силната светлина при пшеница, ечемик, царевица и други /Navaux, 1987; Navaux et al., 1988; Erne & Lannoye, 1989; Керин и др., 1997; Yordanov et al., 1997/.

Schreiber & Berry /1977/ отчитат измененията в хлорофилната флуоресценция в интактен лист, корелиращи с повреди във фотосинтетичния апарат.

Maury et al. /1996/ изследват два слънчогледови генотипа: F_1 -хбрида "Вики" и бащиния му родител Т32 в условията на воден дефицит и силна светлина за определяне взаимовръзката на водния дефицит с ефективността на ФС2. Наблюдавано е намаление на съотношението F_v/F_m и фотохимичната дейност в ФС2 при Т32, а "Вики" повишава съотношението F_v/F_m и увеличава нетната фотосинтеза с по-висок фотохимичен електрон-трансфер. Авторите стигат до извода, че отговорът на сушавата аклиматизация е предимно генотипно зависим.

**Фотосинтеза при *H. annuus* (2n=34) x *Carduus acanthoides* (2n=22).
Параметри на хлорофилната флуоресценция и концентрацията на пластидните пигменти**

Съотношението между хлорофили и каротиноиди е диагностичен показател – чувствителен маркер, който различава естественото навременно стареене и стареенето, дължащо се на стресови фактори на околната среда /Hendry & Grime, 1993/. Методът за определяне на съдържанието на хлорофили и каротиноиди и съотношението им е описано при пшеница, домати, краставици, салата, грах, ряпа и други /Керин и др., 1997/.

Petrova et al. /1998/, изучавайки на полето пет различни линии слънчоглед и техни стерилни аналози, установяват, че те не се различават по признаците: височина на стъблото, брой листа, диаметър на питата, добив семена на растение, маса на 1000 семена и съдържание на масло, но при стерилните аналози е отчетено повишено съдържание на хлорофил “a” и съотношението на хлорофилите “a”/“b”. Не е определена взаимовръзка между хлорофил “b” и каротиноидите.

Настоящото изследване е направено с цел да се установи състоянието и функционалната активност на фотосинтетичния апарат чрез количествено определяне на хлорофилната флуоресценция и съдържанието на пластидните пигменти на родителите и междуродовия хибрид *Helianthus annuus* x *Carduus acanthoides*, където се очакваха нарушения във фотосинтетичния апарат.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

В изследването са включени културен слънчоглед *Helianthus annuus* (линии 6116, 6234 и 12 /декоративна форма/), *Carduus acanthoides* и хибрида *Helianthus annuus* x *Carduus acanthoides*.

Параметрите на **хлорофилната флуоресценция** са измерени *in vivo* с флуориметър PEA (Hansatech, UK). Системата за измерване на флуоресценцията действа на принципа на импулсната модулация (импулсно модулираната флуоресценция). Измерванията са правени в три повторения.

Измерващият блок се прикрепва към растителния лист без откъсване от



растението. Мястото се затъмнява за 5 минути. След тъмнината адаптация на пробата се включва измерващата светлина. След осветяването на растителния обект флуоресценцията (F) нараства незабавно до определено ниво (F_0 или F_0 – начална флуоресценция), последвано от бързо нарастване и достигане до своя максимум (F_m – максимална флуоресценция, която се достига за определено максимално време, T_m). Разликата между максималната и началната флуоресценция ($F_m - F_0$) е известна като вариабилна флуоресценция (F_v).

Интензивността на светлината и продължителността на измерването се задават чрез вградения микрокомпютър, а на екрана на апарата се изписват готовите резултати на F_0 , F_m , F_v , T_m и

отношението F_v/F_m .

Фотохимичният компонент на флуоресцентното гасене (q_Q) е изчислен по метода на Schreiber et al. /1986/:

$$q_Q = (F_m - F_v) / (F_m - F_0), \text{ или } q_Q = F_0 / F_v$$

Растителният материал, необходим за **екстрахиране на пигментите** е подбиран чрез средна проба от еднакви по възраст листа, в три повторения по 0.2 g. Добавя се органичният разтворител - ацетон 80 % - и пробата се хомогенизира в порцеланов хапан. Стриването продължава до получаване на хомогенна маса. Разтворителят се прибавя на малки порции, като всеки път материалът се разтрива добре и се филтрува през стъклен шоклов филтър g_2 на водна помпа. Разтриването и екстрахирането продължават до пълното обезцветяване на хомогенната проба. Обемът на екстракта се довежда до точна мярка – 20 ml. Полученият сумарен извлек на пластидните пигменти се използва за количественото им определяне, което се извършва спектрофотометрично. Оптическата плътност (екстинкцията: E) на филтрата се измерва с помощта на спектрофотометър “Spekol 11” (K. Zeiss, Germany). Измерването на съдържанието на пигментите е отчетено при съответни максимуми на поглъщане (l nm): каротиноиди – 470 nm (син филтър); хлорофил “b” – 645 nm (червен филтър); хлорофил “a” – 663 nm (червен филтър). Максималното поглъщане на сумарния екстракт, освен от концентрацията на пигментите, зависи също и от характера на разтворителя. Концентрацията на пигментите (mg/l) е определена по формулите за органичния разтворител – ацетон 80 % /MacKinney, 1941; Arnon, 1949; Lichtenthaler, 1987/:

$$\begin{aligned} C_a &= 12.7 E_{663} - 2.69 E_{645} \\ C_b &= 22.9 E_{645} - 4.68 E_{663} \\ C_{a+b} &= 8.02 E_{663} + 20.2 E_{645} \\ C_{car} &= (1000 E_{470} - 1.82 C_a - 85.02 C_b) / 198 \end{aligned}$$

Съдържанието на пластидните пигменти (X) се преизчислява по следна формула:

$$X = (C \times V \times 1000) / P \times 1000 \text{ mg/g материал, където:}$$

- X – количеството на пигментите в mg на g свежо тегло на материала;
- C – концентрацията на пигмента, изчислена по формулата при спектрофотометрично определяне;
- V – обемът на извлекa в ml;
- P – теглото на пробата в mg;
- 1000 – в числителя = mg в 1 g растителен материал;
- 1000 – в знаменателя = ml в 1 l разтвор.

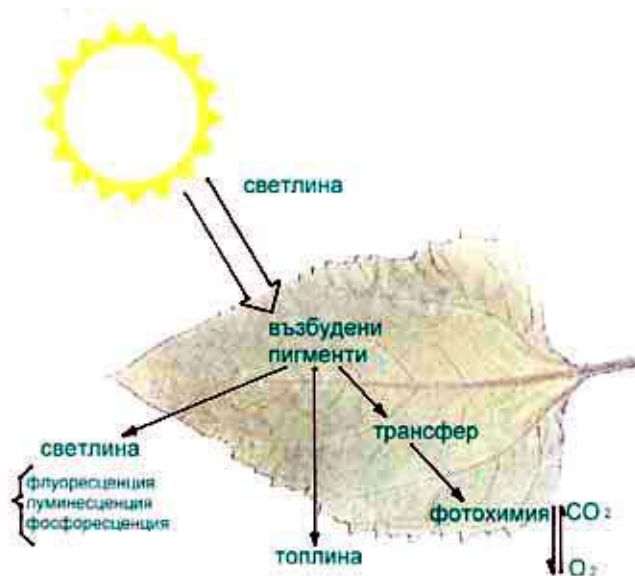
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Хлорофилна флуоресценция

По Erneз and Lannoуe /1989/ част от абсорбираната от хлорофилните пигменти

**Фотосинтеза при *H. annuus* (2n=34) x *Carduus acanthoides* (2n=22).
Параметри на хлорофилната флуоресценция и концентрацията на пластидните пигменти**

светлинна енергия се използва от фотосинтезата, а излишъкът се освобождава (дисипира) във вид на флуоресцентно излъчване (светлинни кванти с големина около 690 – 760 nm) и топлина (фиг. 1).



Фиг. 1. Процеси, протичащи в растителния лист след светлинно възбуждане (по Ernež and Lannoey, 1989).

Нашето проучване върху хлорофилната флуоресценция включва измерването и при две различни температури. Резултатите са представени в таблица 1 и 2.

F_0 е нивото на постоянна флуоресцентна емисия на напълно тъмнинноадаптиран растителен лист. При тези условия повечето реакционни центрове на Фотосистема 2 (ФС2) са отворени и първичният акцептор на електрони (Q_A) е напълно окислен. F_0 се влияе от всеки екологичен стрес, който причинява структурни промени на пигментно ниво на ФС2. Получените резултати за културния слънчоглед и хибрида *H. annuus* x *C. acanthoides* при две различни температури сочат слабо увеличение на F_0 , т.е. няма увреждания на ФС2. F_m се е понижило след излагане на листата на неувреждаща температура. F_v е понижено, но най-вероятно това не е довело до увреждания на тилакоидите. Отношението F_v/F_m е пропорционално на квантовия добив на I фотохимичните процеси и силно корелира с квантовия добив на нетофотосинтезата, който е мярка за ефективността, с която се използва светлината. При увеличаване на температурата при *H. annuus* и *H. annuus* x *C. acanthoide* то се понижава. Отношението F_m/F_0 зависи от водния потенциал на листата на *H. annuus* и *H. annuus* x *C. acanthoides*. При увеличаване на температурата то се понижава. След няколко дни засушаване ще липсва вариабилна флуоресценция и съотношението F_m/F_0 може да спадне до 1, а след възстановяване на нормалното водоснабдяване отношението F_m/F_0 се възстановява до около 3.0. Получените тук резултати представляват голям интерес поради факта, че независимо от засушаването на полето това съотношение е около два пъти по-голямо дори от приетите стойности за нормално водоснабдяване. Стойностите на флуоресцентното гасене (q_0), което дава информация за

фотосинтетичната електрон-трансферна активност в листата, с повишаване на температурата се повишават при *H. annuus* и F₁-хибрида.

Таблица 1. Хлорофилна флуоресценция и флуоресцентно гасене (q_Q) при две различни температури

	<i>Carduus acanthoides</i>	<i>Helianthus annuus</i>		<i>H.annuus</i> x <i>C. acanthoides</i> (F1*)	
	t ₁ ⁰	t ₁ ⁰	t ₂ ⁰	t ₁ ⁰	t ₂ ⁰
F ₀	618	438	495	414	450
F _m	3213	3072	2307	2887	2651
F _v	2595	2634	1814	2473	2200
T _m	263	287	200	404	399
F _v /F _m	0.807	0.857	0.783	0.856	0.827
F _m /F ₀	5.20	7.01	4.66	6.97	5.89
q _Q	0.24	0.17	0.27	0.17	0.20

t₁⁰ = 17⁰; t₂⁰ = 23⁰C

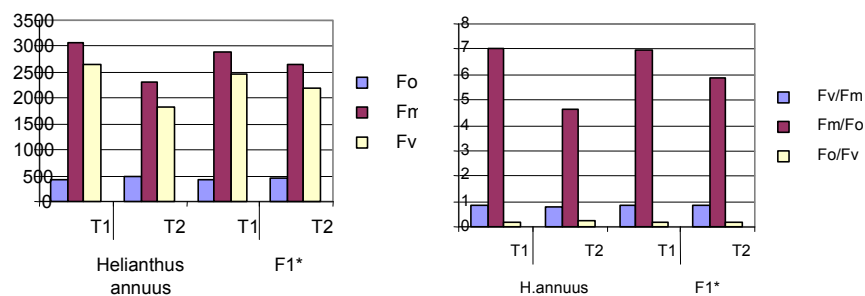
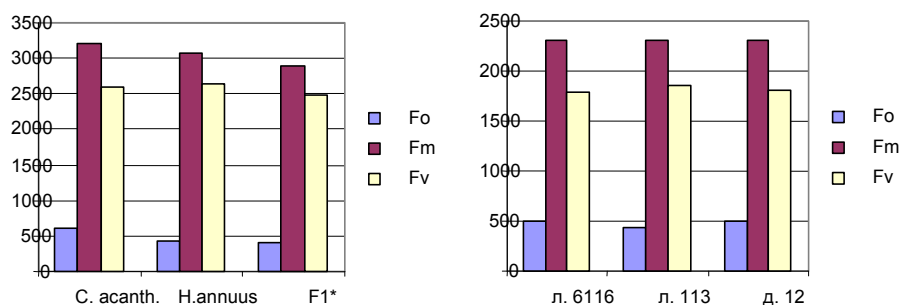


Таблица 2. Хлорофилна флуоресценция и флуоресцентно гасене (q_Q) при различни образци *Helianthus annuus*

	л. 6116	л. 6234	л. 12
F ₀	505	440	495
F _m	2300	2299	2307
F _v	1795	1859	1814
T _m	261	277	200
F _v /F _m	0.780	0.807	0.783
F _m /F ₀	4.55	5.23	4.66
q _Q	0.28	0.24	0.27



**Фотосинтеза при *H. annuus* (2n=34) x *Carduus acanthoides* (2n=22).
Параметри на хлорофилната флуоресценция и концентрацията на пластидните пигменти**

Началната хлорофилна флуоресценция (F_0) при една и съща температура за *Carduus acanthoides*, сравнена с тази за *H. annuus* и техния F_1 -хибрид, е значително по-висока, но съотношението F_v/F_m показва близки резултати, т.е. ефективност, с която се използва светлината от двата родителя и техния хибрид, е почти еднаква. Тези резултати могат да се обясни с различията в морфологията на листите на отделните образци. F_m и F_v са с близки резултати. Стойностите на отношението F_m/F_0 при *H. annuus* и F_1 -хибрида са еднакви и по-високи от тези при *C. acanthoides*. Флуоресцентното гасене е еднакво за културната форма и хибрида и по-ниско от това за *C. acanthoides*.

При сравнение на трите линии от културния слънчоглед при една и съща температура, резултатите за различните параметри са с приблизително еднакви стойности.

В заключение на всичко това можем да споменем, че не са отчетени нарушения във фотосинтетичния апарат (състоянието и функционалната активност) на междуродовия хибрид *H. annuus* x *Carduus acanthoides*. Образците на родителските форми и хибрида използват светлината с еднаква ефективност. Резултатите за различните параметри при трите изследвани линии са близки.

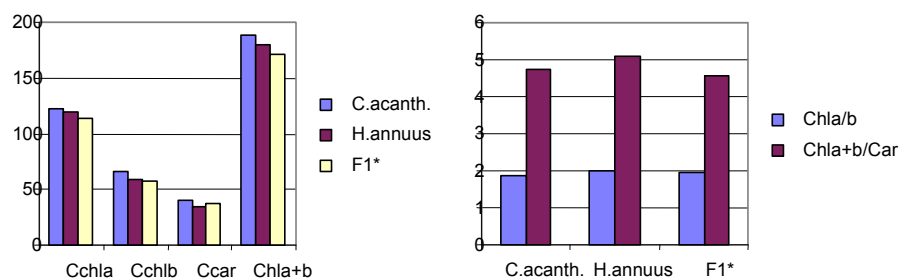
Концентрация на пластидните пигменти

Резултатите, получени за концентрацията на пластидните пигменти и съотношенията между тях, са представени в таблица 3.

Таблица 3. Концентрация на пластидните пигменти съотношенията между тях

Концентрация	<i>Carduus acanthoides</i>	<i>Helianthus annuus</i>	<i>H.annuus</i> x <i>Carduus acanthoides</i> (F1*)
Chl _a	122.42	119.87	113.09
Chl _b	65.90	59.40	57.42
Chl _{a+b}	188.32	179.27	170.51
Car	39.75	35.25	37.25
Chl _{a/b}	1.86	2.02	1.97
Chl _{a+b} /Car	4.74	5.09	4.58

Концентрация на пластидните пигменти за различните образци е различна, но стойностите и са близки.



Концентрация на пластидните пигментите (mg/l)

Съотношението хлорофил "a"/хлорофил "b" в надземните органи широко се използва като индикатор на реакцията към силата на светлината, а също така и като ранен индикатор на стареенето. Получените резултати не показват

съществени разлики в това съотношение за различните растения. То варира в границите от 1.86 (*Carduus acanthoides*) до 2.02 (*H. annuus*).

Съотношението между хлорофили и каротиноиди е чувствителен маркер, който различава естественото навременно стареене и стареенето, дължащо се на стресови фактори на околната среда (Hendry and Grime, 1993). Това съотношение дава също близки резултати за отделните растения, като варира в границите от 4.58 (*H. annuus* x *Carduus acanthoides*) до 5.09 (*H. annuus*).

Стойностите на концентрацията на пластидните пигменти и двете съотношения са близки и при трите изследвани образеца. Самостоятелно тези резултати не ни дават точна представа за това, дали условията оказват влияние върху растенията, но показват сходният начин на реакция независимо от това, че са представители на различни родове.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При сравнение на образците при една и съща температура, резултатите за различните параметри са с приблизително еднакви стойности. Получените резултати за хибрида *H. annuus* x *C. acanthoides* и неговите родители при две различни температури сочат увеличение на стойностите за F_0 и q_0 и понижение на стойностите за F_m , F_v , F_v/F_m и F_m/F_0 . Не са отчетени нарушения в състоянието и функционалната активност на фотосинтетичния апарат при междуродовия хибрид *H. annuus* x *Carduus acanthoides*. Образците на родителските форми и хибрида използват светлината с еднаква ефективност. Резултатите за различните параметри при трите изследвани линии са близки.

Стойностите на концентрацията на пластидните пигменти и съотношенията между хлорофил "a" и хлорофил "b" и между хлорофили и каротиноиди са близки. Това показва сходство в начина на реагиране при изследваните образци независимо от това, че са представители на различни родове.

ЛИТЕРАТУРА

- Йорданов, И., Дилова С., Станев В., Петкова Р., Ангелова Т. и Чичев П., 1984. Формиране и функционална активност на фотосинтетичния апарат. София, 230 с.
- Керин В., Ц. Цонев, М. Моецка-Берова, Анд. Василев, Зл. Златев, 1997. Съвременни методи за анализ в растителната физиология. Висш Селскостопански Институт - Пловдив.
- Arnon D. I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, Plant Physiol. 24: 1 - 15.
- Ernez M. and R. Lannoye, 1989. Quantification of physiological disorders in stressed plants. Physiology-Breeding of Winter Cereals for Stressed Mediterranean Environments, Montpellier, France, 3-6 July 1989, Ed. INRA, Paris 1991 (Les Colloques n°55).
- Navaux M., 1987. Effects of chilling on the redox state of the primary electron acceptor Q_A of photosystem II in chilling-sensitive and resistant plant species. Biochim Biophys. Acta 25: 735 - 743.
- Navaux M., M. Ernez, R. Lannoye, 1988. Selection de varietes de ble dur (*Triticum durum* Desf.) et de ble tendre (*Triticum aestivum* L.) adaptees a la secheresse par la mesure de l'extinction de la fluorescence de la chlorophylle *in vivo*. Agronomie 8 (3): 193 - 199.
- Hendry G. A. F. and J. P. Grime, 1993. Methods in comparative plant ecology. Chapman and Hall, The Hague, Netherlands.
- Horie T., 1977. Simulation of sunflower growth. I. Formulation and parametrization of dry

**Фотосинтеза при *H. annuus* (2n=34) x *Carduus acanthoides* (2n=22).
Параметри на хлорофилната флуоресценция и концентрацията на пластидните пигменти**

matter production, leaf photosynthesis, respiration and partitioning of photosynthates. Bull. Natl. Inst. Aric. Sci. Ser. A 24: 45 – 70.

- Lichtenthaler H. K., 1987.** Chlorophylls and carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. In: Methods in Enzymology (Pasher L., R. Douce, eds.), Academic Press, New York, 148: 350 – 382.
- MacKinney G., 1941.** Absorption of light by chlorophyll solutions. J. Biol. Chem. 140: 315 - 322.
- Maury P., F. Mojayad, M. Berger, C. Planchon, 1996.** Photochemical response to drought acclimation in two sunflower genotypes. Physiologia Plantarum 98 (1): 57 - 66.
- Paul M. J., D. W. Lawlor, S. P. Driscoll, 1990.** The effect of temperature on photosynthesis and carbon fluxes in sunflower and rape. J. Exp. Bot. 41: 547 – 555.
- Petrova V., I. Ivanova, P. Ivanov, P. Petrov, 1998.** Influence of the cytoplasmatic male sterility on the pigment content and the superoxidedismutase and peroxidase activity. 11th Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology, Varna, 7-11 Sept., 1998, Bulg. J. Plant Physiology, pp.255.
- Schreiber U. and J. A. Berry, 1977.** Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in intact leaves correlated with damage of photosynthetic apparatus. Planta 136: 233 – 238.
- Schreiber U., U. Schliwa, W. Bilger, 1986.** Continuous recording of photochemical and non-photochemical fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. Photosynthesis Res. 10: 51 - 62.
- Skoric D., T. Vrebalov, T. Cupina, J. Turkulov, R. Marinkovic, St. Masirevic, J. Atlagic, L. Tadic, R. Sekulic, D. Stanojevic, M. Kovacevic, V. Jancic, Zv. Sakac, 1989.** Suncokret. Nolit, Beograd, p. 636.
- Warren Wilson J., 1966.** Effect of temperature on net assimilation. Ann. Bot. N. S. 30: 753 – 761.
- Yordanov I., Tsonev T., Goltsev V., Kruleva L. and Velikova V., 1997.** Interactive effect of water deficit and high temperature on photosynthesis of sunflower and maize plants. 1. Changes in parameters of chlorophyll fluorescence induction kinetics and fluorescence quenching. Photosynthetica 33 (3-4): 391 - 402.