

УДК 581.08.132:631.417.2

ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В РАСТЕНИЯХ ПРИ ВВЕДЕНИИ ГУМАТА НАТРИЯ В ПИТАТЕЛЬНЫЙ РАСТВОР

Л. Ф. БОБЫРЬ, М. Ф. ТРИФОНОВА, А. И. ГОРОВАЯ

(Кафедра физиологии растений)

Показано влияние физиологически активных гумусовых веществ на фотосинтетические процессы у растений — работу протонной помпы хлоропластов, размер фотосинтетической единицы фотосистемы 2 и количество ее реакционных центров. Более восстановленные гумусовые фракции обладали и более эффективным стимулирующим действием. Обработка семян и растений гумусовым препаратом ускорила восстановление фотосинтетических процессов, подавленных гербицидом.

Гумусовые вещества широко распространены в природе и содержатся в торфах, бурых углях, сапропелях, некоторых сланцах и других каустобиолитах. Физиологическая активность гумусовых веществ является твердо установленным фактом, а их действие на растения сложно и многогранно: оно затрагивает различные уровни организации живой структуры и отражается на многих физиологических и биохимических процессах. Установлено [20, 23] влияние гумусовых веществ на ростовые процессы у растений, причем оно отличается средней интенсивностью и сравнительно большой длительностью. Ведущая роль в стимуляции ростовых процессов у растений

принадлежит «ядру» гуминовых молекул [18, 23].

Суть физиологического эффекта гумусовых веществ заключается в том, что они способствуют запуску белоксинтезирующей системы [20], а это особенно важно для растений при неблагоприятных условиях среды, когда реализация генетической информации затруднена. Усиление синтеза белков происходит двумя путями. В первом случае гумусовые вещества, проникнув внутрь растений, активируют там окислительно-восстановительные процессы, что возможно благодаря наличию в их структуре хиноидных и полифенольных групп. Активируя транспорт электронов в цепях клеточных органелл, окислительное

и фотосинтетическое фосфорилирование, гумусовые вещества способствуют синтезу дополнительного количества АТФ. В дальнейшем АТФ используется в синтезе нуклеиновых кислот, что обуславливает ускоренное образование белков. Во втором случае возможно непосредственное влияние гумусовых веществ на белоксинтезирующую систему за счет депрессии соответствующих участков генома, т. е. здесь они выполняют роль триггеров [24].

Несмотря на большой объем накопленного исследователями экспериментального материала, механизм действия гумусовых веществ на живые структуры до конца не выяснен. До сих пор все его схемы можно рассматривать лишь как гипотетические.

Основываясь на схеме Л. А. Христовой [29], мы исследовали влияние физиологически активных гумусовых веществ на первичные процессы фотосинтеза. В частности, изучали действие гумусовых веществ на структурно-функциональное состояние фотосинтетического аппарата, определяли связи между окислительно-восстановительным состоянием гумусовых препаратов и их физиологической активностью, а также возможные пути снятия гумусовыми веществами гербицидного блокирования фотосинтетических процессов.

Методика

В работе применялись различные методики, позволяющие изучить структурно-функциональную активность выделенных и нативных хлопчатоплодов, окислительно-восстановительное состояние гумусовых препаратов.

К перспективным методам исследования фотосинтетических параметров в нативной системе относится регистрация флуоресценции и длительного послесвечения (замедленной флуоресценции) листьев.

С целью использования этого метода в экспериментах нами [3] была разработана и собрана установка, позволяющая одновременно измерять флуоресценцию, миллисекундный ($\tau = 0,27 \cdot 10^{-3}, 1,31 \cdot 10^{-3}$ с) и децисекундный ($\tau = 0,088 \div 0,112$ с) компоненты длительного послесвечения сразу с 5 листьев. Флуоресценцию и послесвечение возбуждали светом с диапазоном длин волн 380—620 нм. Освещенность листа — 40 клк. Флуоресценцию в области 640—720 нм выделяли набором светофильтров УФС-6 и КС-14. Сигналы с фотоэлектронных умножителей (ФЭУ-38) поступали на усилитель УБП-2-03, а с него — на быстродействующий самописец Н327-5.

Эта же установка позволяла регистрировать переменную флуоресценцию не отделенных от растения листьев (слабый измерительный свет 380—620 нм давал освещенность листа 1 клк, а сильный действующий белый свет — 40 клк) и световую кривую миллисекундного послесвечения, снимаемую с помощью набора нейтральных светофильтров (максимальная освещенность листа — 44 вт/м²). Источники освещения — галогенные лампы накаливания Narva halogen, 24 В, 250 Вт). Время темновой адаптации листа перед регистрацией — 5 мин).

Изучали следующие параметры индукционных переходов флуоресценции и длительного послесвечения хлорофилла *in vivo*: начальный, максимальный и стационарный уровни переменной флуоресценции (Φ_0 , $\Phi_{\text{макс}}$, $\Phi_{\text{ст}}$); $\Delta\Phi = \Phi_{\text{макс}} - \Phi_0$; $\Phi_{\text{макс}}/\Phi_{\text{ст}}$ и $\Delta\Phi/\Phi_{\text{макс}}$; максимальный и стационарный уровни послесвечения ($I_{\text{макс}}$ и $I_{\text{ст}}$); $I_{\text{макс}} - I_{\text{ст}}$; $I_{\text{макс}}/I_{\text{ст}}$

Инфильтрацию листьев различными препаратами проводили методом центрифугирования при

3000 г [15], время инфильтрации — 10—15 мин.

Хлоропласты из листьев гороха выделяли в среду, содержащую 0,4 моля сахарозы, 0,01 моля NaCl на 0,03 моля трис-HCl буфера pH 7,8 [10]. Среда ресуспендирования — 0,4 моля сахарозы, 0,01 моля NaCl. Фотоиндуцированные сдвиги pH и в суспензии хлоропластов регистрировали потенциометрическим методом [7] с помощью усилителя pH-121 и потенциометра КСП-4. Хлоропласты освещали через водный фильтр и светофильтр КС-14 (освещенность 50 клк). Реакционной средой служила среда ресуспендирования (5 мл), к которой добавляли суспензию хлоропластов в количестве, эквивалентном 50 мкг хлорофилла. Буферную емкость реакционной смеси определяли путем титрования соляной кислотой.

Окислительно - восстановительное состояние гумусовых препаратов определяли потенциометрическим методом с помощью стеклянного электрончувствительного электрода типа ЭОЛ-01 [26].

Из-за низкой электрохимической активности гумусовых кислот для регистрации из окислительно-восстановительных потенциалов применяли медиатор — эквимольярную смесь ферро- и феррицианида [5]. Окислительно - восстановительное взаимодействие гумусовых фракций с цитохромом С оценивали по отношению оптических плотностей при 550 и 520 нм (при восстановлении феррицитохрома С это отношение увеличивалось) [30]. Оптическая плотность смеси гумусовой фракции и феррицитохрома С определялась по отношению к оптической плотности гумусовых фракций (разностный спектр). Концентрация цитохрома С в реакционной среде была равна 0,33 мг/

мл, гумусовых фракций — 0,17 мг/мл.

В работе применяли феррицитохром С фирмы «Biomed-Krakov». Атразин для опытов подвергали 3-кратной переочистке хлороформом. Пользовались следующими гумусовыми препаратами, полученными из торфа лабораторным способом [13]: гуматы натрия (или калия) — смесь солей гуминовых и гиматомелановых кислот, гуминаты — соли гуминовых кислот, гиматомеланаты — соли гиматомелановых кислот, фульваты — соли фульвовых кислот.

Результаты измерений статистически обрабатывали методом малой выборки [12]. В таблицах даны средние арифметические и доверительный интервал при заданном уровне значимости.

Объектами исследования служили горох сортов Рамонский 77 или Львовский зеленозерный (средняя отзывчивость к гербициду и гумусовому препарату) и ячмень сорта Донецкий 8 (высокая чувствительность к атразину и гумусовому препарату).

Проростки гороха выращивали под люминесцентными лампами непрерывное освещение 5 клк) на питательной смеси Кнопа, к которой был добавлен гумат натрия до концентрации 0,01 %. Контроль — проростки на смеси без гумата натрия. На 7-й день после всходов регистрировали различные фотосинтетические параметры во 2-м листе гороха.

Результаты

Под влиянием гумата натрия увеличивалась амплитуда индукционных переходов ($\Phi_{\text{макс}} - \Phi_{\text{ст}}$) флуоресценции и послесвечения (табл. 1). Стационарные уровни флуоресценции и децисекундного компонента послесвечения понижались, а от-

Параметры кинетических кривых индукции флуоресценции и послесвечения листьев у 7-дневных проростков гороха ($\bar{x} \pm t_{05} \cdot S_{\bar{x}}$) на питательной смеси Кнопса (числитель) и при добавлении в нее 0,01 % гумата натрия (знаменатель)

Вид свечения	$I_{\text{макс}}$	$I_{\text{ст}}$	$I_{\text{макс}} - I_{\text{ст}}$	$I_{\text{макс}}/I_{\text{ст}}$
Флуоресценция	$100 \pm 8,6$	$40 \pm 3,1$	$60 \pm 9,0$	$2,50 \pm 0,115$
	$118 \pm 9,2$	$32 \pm 2,9$	$86 \pm 9,7$	$3,68 \pm 0,118$
	$100 \pm 9,0$	$46 \pm 3,6$	$54 \pm 9,7$	$2,17 \pm 0,118$
Децисекундное послесвечение	$115 \pm 10,3$	$38 \pm 3,1$	$77 \pm 10,7$	$3,02 \pm 0,120$
	$100 \pm 8,9$	$20 \pm 1,8$	$80 \pm 9,2$	$5,00 \pm 0,127$
Миллисекундное послесвечение	$125 \pm 10,4$	$32 \pm 2,7$	$93 \pm 10,6$	$3,91 \pm 0,115$

ношение $\Phi_{\text{макс}}/\Phi_{\text{ст}}$ повышалось. Стационарный уровень миллисекундного послесвечения возрастал. В этом же опыте наблюдали некоторое сокращение времени выхода флуоресценции и послесвечения на стационарный уровень под влиянием гумата натрия.

В табл. 2 приведены результаты измерения индукционных переходов переменной флуоресценции хлорофилла на неотделенном 2-м листе 7-дневных проростков гороха, выращенного методом водной культуры на питательной смеси Кнопса при 6-кратной повторности. Влияние гумата натрия проявилось в том, что в опытных вариантах Φ_0 и $\Phi_{\text{макс}}$ были несколько выше контрольных. Повышались также отношения $\Delta\Phi/\Phi_{\text{макс}}$ и $\Phi_{\text{макс}}/\Phi_{\text{ст}}$. Время выхода индукции флуоресценции на $\Phi_{\text{макс}}$ (t_p) уменьшалось.

Анализ индукционных переходов флуоресценции и длительного послесвечения проводили, основываясь на теоретических разработках и экспериментальных данных ряда авторов. Быстрая фаза индукции флуоресценции (OIP) отражает работу электронтранспортной цепи хлоропластов [16]. Медленная индукция флуоресценции (PSMT) изучена гораздо меньше, чем быстрая. Считается [1, 14], что она

обусловлена конформационными превращениями фотосинтетических мембран вследствие их энергизации и связана с биохимическими фотоиндуцированными реакциями, развивающимися после фотосистемы [1]. Отсюда характер индукционных переходов флуоресценции хлорофилла А будет зависеть от реакций фотофосфорилирования и трансмембранного электрохимического градиента ионов и тилакоидах хлоропластов. Чем больше значенie индукционной вспышки и меньше время выхода флуоресценции

Таблица 2

Параметры индукции переменной флуоресценции листьев у 7-дневных проростков гороха ($\bar{x} \pm t_{05} \cdot S_{\bar{x}}$)

Параметры флуоресценции	Питательная смесь Кнопса	Питательная смесь + 0,01 % гумата натрия
Φ_0	$5,0 \pm 0,22$	$6,2 \pm 0,26$
$\Phi_{\text{макс}}$	$14,0 \pm 0,68$	$24,1 \pm 0,79$
$\Phi_{\text{ст}}$	$9,1 \pm 0,51$	$8,4 \pm 0,43$
$\Delta\Phi$	$9,0 \pm 0,71$	$17,9 \pm 0,83$
$\Delta\Phi/\Phi_{\text{макс}}$	$0,64 \pm 0,093$	$0,74 \pm 0,057$
$\Phi_{\text{макс}}/\Phi_{\text{ст}}$	$1,54 \pm 0,074$	$2,87 \pm 0,061$
t_p мс*	$1400 \pm 95,6$	$1213 \pm 48,9$

* t_p — время достижения $\Phi_{\text{макс}}$

на стационарный уровень, тем соответственно больше протонный градиент и время его установления на тилакоидной мембране.

Длительное послесвечение является результатом обратной рекомбинации продуктов фотосистемы 2 — первичных акцептора электронов Q и донора Z [2]. Количество состояний Q^-XZ^+ и их рекомбинация зависят от работы электронтранспортных цепей хлоропластов и системы выделения O_2 [9]. Послесвечение состоит из нескольких компонентов с различным временем жизни. Такой многокомпонентный состав зависит не от рекомбинации многих фотоактивных продуктов, а от одного, но отдельные фотохимические процессы изменяют энергию активации послесвечения.

Быстрая фаза миллисекундного послесвечения (OI) отражает процесс разделения зарядов в реакционном центре фотосистемы 2, а медленная фаза (IPS) — эффективность электронного транспорта в фотосинтетических цепях и образование трансмембранного градиента ионов на тилакоидах хлоропластов. Амплитуда медленной фазы ($I_{\text{макс}} - I_{\text{ст}}$) и стационарный уровень миллисекундного послесвечения повышаются с увеличением скорости транспорта электронов и протонного градиента в хлоропластах и уменьшаются при разобщении. В то же время амплитуда индукционной вспышки может уменьшиться и при активации потребления АТФ [6, 19].

Стационарный уровень децисекундного компонента послесвечения находится в обратной зависимости от интенсивности фотосинтеза [19]. При разобщении транспорта электронов и фотофосфорилирования время выхода послесвечения на стационарный уровень увеличивается.

Значения индукционных вспышек миллисекундного и децисекундного компонента послесвечения соответствуют скорости фотоассимиляции CO_2 листьями.

Основываясь на данном анализе индукции флуоресценции и послесвечения, можно оценить влияние гумусового препарата на процессы фотосинтеза (табл. 1). Увеличение амплитуды индукционной вспышки флуоресценции и скорейший выход ее на стационарный уровень, более интенсивное послесвечение у листьев гороха, выросшего на питательной смеси с гуматом натрия, — все это говорит об активации транспорта электронов и фотофосфорилирования, увеличении трансмембранного электрохимического градиента протонов в тилакоидах хлоропластов. Увеличение отношений $I_{\text{макс}}/I_{\text{ст}}$ флуоресценции и децисекундного послесвечения и понижение их стационарных уровней свидетельствуют о более интенсивной ассимиляции CO_2 листьями и активном относительном приросте биомассы под влиянием гумата натрия.

На это же указывают и данные табл. 2. Согласно ряду исследований [6], увеличение отношения $\Delta\Phi/\Phi_{\text{макс}}$ говорит о повышении энергетической эффективности работы реакционных центров фотосистемы 2. Переменная флуоресценция $\Delta\Phi$ и отношение $\Phi_{\text{макс}}/\Phi_{\text{ст}}$ коррелируют с интенсивностью фотосинтеза. Как известно, при полностью закрытых реакционных центрах значение $\Phi_{\text{макс}}$ будет коррелировать с содержанием пигментов в листьях, что и наблюдалось в нашем опыте. Так, количество хлорофиллов (А+В) было равно $230 \pm 15,3$ мг % в контрольных вариантах и $292 \pm 17,8$ мг % — в опытных, а $\Phi_{\text{макс}}$ — соответственно $14,0 \pm 0,68$ и $24,1 \pm 0,79$ (табл. 2).

Время выхода переменной флуоресценции на максимальный уровень (t_p) может служить приближенным количественным показателем размера фотосинтетической единицы фотосистемы 2. Чем меньше t_p , тем больше размер фотосинтетической единицы [28, 31]. Из этого следует, что под влиянием гумата натрия в период формирования фотосинтетического аппарата несколько увеличивается размер фотосинтетической единицы фотосистемы 2 (табл. 2). Следует, однако, иметь в виду, что взаимодействие между фотосистемами 2 и 1 усложняет интерпретацию индукционной кривой флуоресценции.

Обработка листьев диуроном приводит к блокированию взаимодействия между фотосистемами. Миллисекундное послесвечение инфльтрированных диуроном листьев будет пропорционально количеству реакционных центров фотосистемы 2, а с увеличением интенсивности возбуждающего света насыщение этих центров наступает раньше у образцов с большим размером фотосинтетической единицы фотосистемы 2 [6].

На рис. 1 приведены световые кривые стационарных уровней миллисекундного послесвечения листьев гороха, инфльтрированных раствором диуронона (10 мкмоль). Они показывают, что полунасыщающая интенсивность света, возбуждающего послесвечение, ниже у листьев растений, которые выращены на питательной смеси с добавкой гумата натрия. При насыщающей интенсивности возбуждающего света послесвечение у них больше, чем в контроле. Все это говорит о том, что под влиянием гумата натрия несколько увеличивались размер фотосинтетической единицы и количество реакционных центров фотосистемы 2 на единицу площади листа. Следует отметить, что наблюдае-

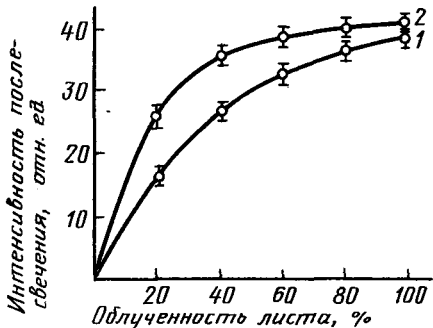
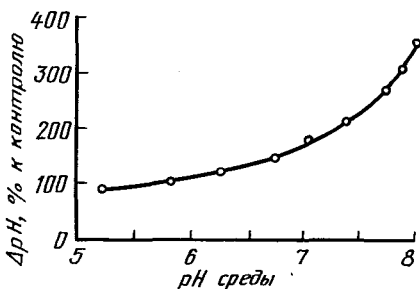


Рис. 1. Световые кривые миллисекундного послесвечения 2-го листа 7-дневных проростков гороха, инфльтрированного раствором диуронона из расчета 10 мкмоль/л. 1 — контроль, 2 — в среду добавлен 0,01 % раствор гумата натрия.

мый эффект возможен только в результате активации работы белоксинтезирующей системы у растений [8], т. е. существует косвенный путь влияния гумусовых препаратов на фотосинтетические процессы.

Таким образом, вызванное гумусовым препаратом повышение количества реакционных центров фотосистемы 2 и их пропускной способности приводит в конечном итоге к увеличению ассимиляции CO_2 и фотосинтетической продуктивности у гороха (повышение значе-

Рис. 2. Влияние гумата натрия на трансмембранный протонный градиент в зависимости от pH реакционной среды хлоропластов гороха.



ний последних двух параметров под влиянием гуматов натрия было показано ранее [4]. Подобные изменения структурно-функционального состояния фотосинтетического аппарата расширяют зону физиологически активной радиации, где она используется с более высоким КПД. Так, при уменьшении интенсивности света предпочтительнее фотосинтетический аппарат с более высокими размером фотосинтетической единицы, содержанием хлорофилла, площадью листовой поверхности, активностью фотофосфорилирования. В условиях высокой инсоляции эффективнее работает фотосинтетический аппарат с повышенными количеством реакционных центров и их пропускной способностью, с активным газообменом.

Анализ индукционных переходов флуоресценции и послесвечения дает опосредованное качественное представление о функциональной активности фотосинтетического аппарата в нативной системе. Количественно работу протонной помпы оценивали потенциометрическим методом на выделенных из листьев горфа хлоропластах. Испытывали эффективность влияния различных гумусовых фракций, полученных из низинного осоково-тростникового торфа, на эндогенные фотоиндуцированные сдвиги рН суспензии хлоропластов.

Как видно из табл. 3, добавление гумусовых фракций к реакционной среде с хлоропластами приводит к активации протонной помпы (сразу же после добавки), что говорит о наличии прямого их влияния на фотосинтетические процессы. Стимулирующий эффект возрастал в ряду: фульвокислоты — гуминаты — гуматы — гиматомеланаты — ядерные фрагменты гиматомелановых кислот. Влияние гумусовых препаратов на протонную пом-

пу резко повышалось с увеличением рН реакционной среды хлоропластов (рис. 2).

Если гумусовые фракции перед добавкой к хлоропластам облучали ультрафиолетовым светом (от ртутной лампы ДРШ-250) в течение 2—3 ч, эффект активации исчезал. Известно, что под влиянием УФ происходит частичное окисление и деструкция гумусовых веществ [11]. По-видимому, за влияние на протонную помпу хлоропластов ответственна ядерная структурная часть гумусовых молекул, которая и дала максимальный стимулирующий эффект (табл. 3).

С увеличением действующей концентрации гумусовых фракций стимулирующий эффект меняется на ингибирующий. Такой характер влияния физиологически активных гумусовых веществ на фотосинтетические процессы позволяет рассматривать их как экзогенные регуляторы.

Следует отметить, что наблюдаемое в опыте увеличение фотоинду-

Таблица 3
Работа протонной помпы в хлоропластах при добавлении в их суспензию различных гумусовых фракций (рН 6,9)

Гумусовые фракции	Поглощено Н ⁺ хлоропластами		Стимулирующая концентрация фракций, %
	нмоль на 1 мг хлорофилла	в % к контролю	
Без добавок (контроль)	296	100	—
Фульвокислоты	326	110	0,006
Гуминаты натрия	399	135	0,010
Гуматы натрия	410	138	0,009
Гиматомеланаты натрия	427	145	0,004
Ядерные фрагменты гиматомелановых кислот	533	180	0,012

цированных сдвигов рН суспензии хлоропластов под влиянием гумусового препарата могло бы быть результатом проникновения гумусовых молекул внутрь тилакоидов и повышения буферной емкости среды. Однако это маловероятно, так как эффект влияния препарата на протонную помпу проявляется сразу же после добавления его к выделенным хлоропластам. За такой короткий промежуток времени высокомолекулярные гумусовые молекулы не смогут проникнуть сквозь сложно организованную и обладающую высокой селективностью к различным веществам тилакоидную мембрану.

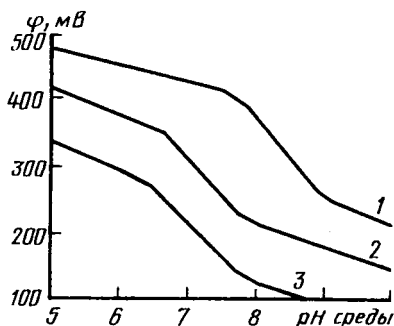
Существует связь между окислительно-восстановительным состоянием гумусовых препаратов и их биологической активностью. Так, с увеличением рН среды окислительно-восстановительный потенциал гумусовых фракций падает (рис. 3) и соответственно они лучше восстанавливают различные экзогенные акцепторы электронов (рис. 4). Стимулирующее влияние гумусовых фракций на работу протонной помпы (рис. 2) и рост биомассы [5] также увеличиваются с повышением рН среды. Окислительно-восстановительный потенциал гумусовых фракций в ряду фульваты — гуматы — гиматомеланаты падает (рис. 3), а стимулирующее влияние на работу протонной помпы в хлоропластах возрастает (табл. 3), т. е. у более восстановленных гумусовых фракций стимулирующий эффект выше. И, наконец, известно [27], что с увеличением рН среды количество спинов у гумусовых кислот растет вследствие стабилизации семихинонных радикалов, тогда как в кислой области (рН 5,0—6,5) электронно-донорные и электронно-акцепторные группы гумусовых молекул теряют свою активность. В то же время некото-

рые авторы [17] связывают биологическую активность гумусовых веществ с количеством парамагнитных центров гумусовых молекул. Чем их больше (а соответственно и выше степень восстановленности), тем ярче биологический эффект.

Фотосинтетический процесс представляет собой последовательную цепь сопряженных окислительно-восстановительных реакций. Влияние различных экзогенных редоксактивных соединений на компоненты фотосинтетических цепей, несомненно, отразится на конечном результате — накоплении восстановленных фотосинтетических продуктов.

Нами проводились исследования влияния гумусовых фракций на различные компоненты электронтранспортных цепей клеточных органелл. В опытах *in vitro* показано, что гумусовые вещества способны непосредственно окислять никотинамидадениндинуклеотид восстановленный (НАДН₂) [5] и восстанавливать феррицитохром С (рис. 4). Степень окисления НАДН₂ гумусовыми фракциями увеличивалась в ряду гиматомеланаты —

Рис. 3. рН-потенциал диаграммы гумусовых фракций, полученных из низинного осоково-тростникового торфа. 1, 2 и 3 — соответственно 0,5 % растворы фульватов, гуматов и гиматомеланатов натрия.



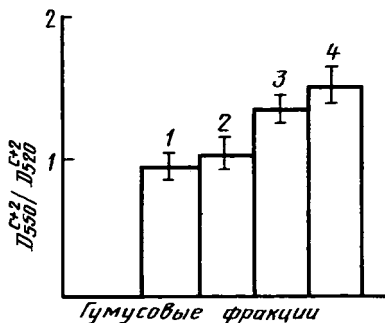
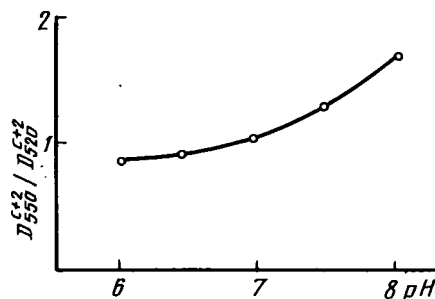


Рис. 4. Восстановление феррицитохрома С под влиянием гумусовых фракций (концентрация цитохрома С в реакционной среде — 0,33 мг/мл, гумусовых фракций — 0,17 мг/мл).

1 — контроль; 2 — фульваты калия; 3 — гуминаты калия; 4 — гиматомеланаты калия.

гуматы — фульваты. Степень восстановления феррицитохрома С в этом ряду падала (рис. 4). С увеличением рН среды возрастало и восстановление цитохрома гумусовыми фракциями, однако зависимость между этими параметрами была нелинейной (рис. 5), что можно объяснить характером изменения окислительно-восстановительного потенциала гумусовых фракций (рН-потенциал — диаграмма на рис. 3).

Рис. 5. Восстановление цитохрома С гуматом натрия при разных значениях рН среды (концентрация цитохрома С в реакционной среде — 0,33 мг/мл, гумата натрия — 0,17 мг/мл).



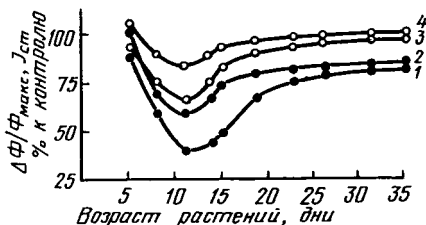
В модельной тройной системе НАДН₂ — гуминовые вещества — феррицитохром С наблюдалось [5] восстановление цитохрома за счет электронов НАДН₂. В такой системе гумусовые вещества подвергались обратимым окислительно-восстановительным превращениям и осуществляли эстафетную передачу электронов от НАДН₂ к феррицитохрому С. Неизвестно, однако, могут ли протекать такие шунтирующие реакции *in vivo*.

При воздействии на растения экстремальных факторов блокируются различные участки цепи транспорта электронов [22].

Шунтируя этот блок, гумусовые вещества могли бы способствовать скорейшему восстановлению подавленных неблагоприятными факторами среды фотосинтетических процессов. Однако такая схема действия гумусовых веществ является только предположением. Главная трудность в этом вопросе заключается в отсутствии убедительных экспериментальных данных о том, как и в каком состоянии поступают (и поступают ли) гумусовые молекулы внутрь клетки.

Рис. 6. Переменная флуоресценция (1, 2) и стационарный уровень миллисекундного послесвечения (3, 4) листьев ячменя в полевом опыте.

1, 3 — семена высеваны в почву с атразином (2 кг/га); 2, 4 — семена, обработанные гумусовым препаратом, посеяны в эту же почву; контроль — растения из не обработанных препаратом семян и посеянных в почву без атразина.



Как прямое влияние гумусовых веществ на фотосинтез (работа протонной помпы хлоропластов), так и косвенное (изменение структурного состояния фотосинтетического аппарата) ведут к повышению фотоассимиляции CO_2 листьями, фотосинтетической продуктивности и в конечном итоге — урожая. В вегетационных и полевых опытах было показано [4], что предпосевная обработка семян растворами гумата натрия, полив или опрыскивание ими растений приводили к достоверной активации фотосинтетических процессов. Разовое воздействие гумусового препарата на растение сказывалось на фотосинтезе около 10 дней и было эффективным вплоть до фазы плодоношения.

Высокий урожай обеспечивается гармоничным сочетанием фотосинтеза, газообмена и архитектоники растений [21]. Нарушение отношений между фотосинтезом как донором ассимилятов, с одной стороны, ростовыми и запасующими процессами как акцепторами этих ассимилятов, с другой — приводит к разбалансу в этой организованной системе и изменению продуктивности. В случае, когда фотосинтетические процессы являются лимитирующими в таком взаимодействии в силу сортовых особенностей, влияния неблагоприятных факторов среды и т. п., применение различных экзогенных физиологически активных веществ, стимулирующих фотосинтез, будет эффективным.

Одним из факторов, приводящих к блокированию фотосинтетических процессов, является применение различных гербицидов. Так, мощными ингибиторами фотосинтеза являются гербициды триазинового ряда. Активное применение гербицидов в сельском хозяйстве ведет к накоплению их в почвах. Актуальной задачей является детоксикация гербицидов, что особенно важно

для повышения продуктивности чувствительных к ним культур севооборота. Возможный путь снятия повреждающего действия гербицидных препаратов — применение физиологически активных веществ, которые ускоряют разложение их в почвах и уменьшают поступление в растения, усиливают инактивацию гербицидов внутри растений и нормализуют подавленные ими физиологические процессы. Такими веществами могут служить гумусовые препараты из торфа [25].

В полевом опыте с ячменем атразин вносили в почву перед посевом в количестве 2 кг/га. О его влиянии на фотосинтез судили по переменной флуоресценции и миллисекундному послесвечению листьев. Высевали как обработанные гуматом натрия семена, так и необработанные [25]. Контролем служили растения, выросшие из не обработанных гумусовым препаратом семян и высеванных в почву без атразина.

На рис. 6 показаны отношение $\Delta\Phi/\Phi_{\text{макс}}$, характеризующее энергетическую эффективность работы реакционных центров фотосистемы 2 [6], и миллисекундный компонент послесвечения листьев ячменя, коррелирующий с трансмембранным градиентом протонов на тилакоидах хлоропластов и со скоростью транспорта электронов в фотосинтетических цепях [19]. В условиях данного опыта влияние атразина на фотосинтез не проявлялось в течение 6—7 дней. Затем наблюдалось снижение энергетической эффективности работы реакционных центров и активности протонной помпы в этом варианте, но спустя 15—20 дней изучаемые параметры в опытных и контрольном вариантах выровнились. В вариантах с обработкой семян гуматом натрия работа реакционных центров и протонной помпы под влиянием атрази-

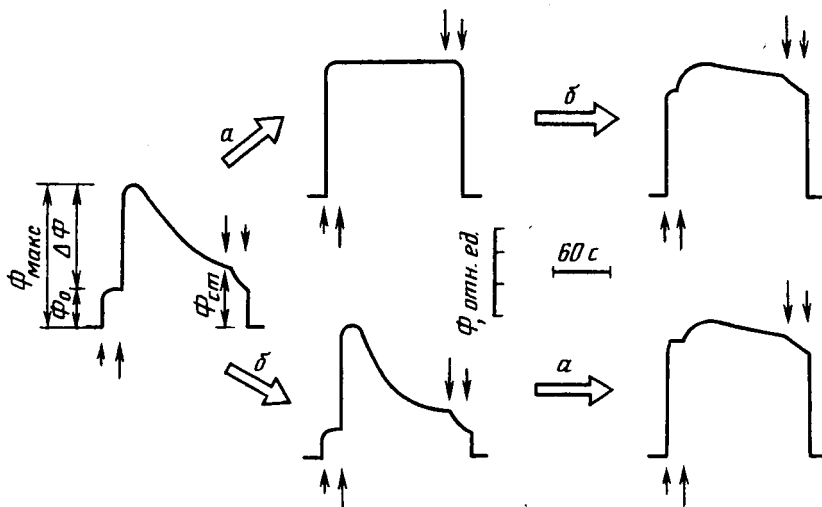


Рис. 7. Изменение переменной флуоресценции листьев гороха при их последовательной инфильтрации атразином (а) и глуматом натрия (б). Короткой стрелкой указано включение и выключение измерительного, длинной стрелкой — действующего света (концентрация глумата натрия — 0,01 %, атразина — 20 мг/л).

на нарушалась меньше и фотосинтез нормализовался быстрее.

Из рис. 7 следует, что инфильтрация листьев раствором атразина приводила к блокированию взаимодействия между фотосистемами 2 и 1 (исчезла переменная флуоресценции $\Delta\Phi$). Последующая инфильтрация этих же листьев глуматом натрия вела к частичному восстановлению взаимодействия (появлялась $\Delta\Phi$). Этот эффект не являлся результатом вымывания атразина, так как инфильтрация листьев не глуматом натрия, а водой (на рис. 7 не показано) не снимала действия атразина. В случае, когда листья сначала инфильтрировали глуматом натрия, а затем атразином, взаимодействие между фотосистемами подавлялось, но не до конца, так как еще сохранялась $\Delta\Phi$ (в условиях опыта).

Известно [34], что повреждающее действие многих гербицидов

(например, имеющих структурные группы $\text{NH}-\text{C}=\text{O}$, $\text{S}=\text{C}-\text{NH}$ или $\text{H}-\text{C}=\text{N}$) направлено на транспорт электронов в фотосинтетических цепях хлоропластов. Они прерывают поток между первичным (Q) и вторичным (B) акцепторами электронов фотосистемы 2. По распространенной гипотезе [32, 33], механизм повреждающего действия следующий. В хлоропластах Q и B находятся в едином комплексе со структурным белком хлоропластов ($Q-B$ — белок). Большим сродством к белку обладает B , а не его восстановленная форма (B^- или B^{2-}). Гербицид, проникая в клетку, связывается с рецепторным белком, конкурируя за участок связывания с B (а не с B^- или B^{2-}). В результате окислительно-восстановительное взаимодействие $Q-B \rightleftharpoons QB^-$ сдвигается влево и

транспорт электронов в фотосинтетических цепях тормозится.

Исходя из этого можно предположить следующие равновероятные пути частичного снятия гербицидного блока гумусовыми веществами:

— гуматы натрия инактивируют атразин за счет образования с ним комплекса;

— гуматы натрия конкурируют с гербицидом за участки связывания рецепторного белка хлоропластов, не прерывая при этом транспорт электронов (образованные шунтирующего пути);

— гуматы натрия влияют на окислительно-восстановительное состояние компонентов электрон-транспортных цепей хлоропластов, нарушенное гербицидом.

Заключение

Из представленных в работе данных следует, что физиологически активные гумусовые вещества могут оказывать как прямое, так и косвенное регулирующее влияние на фотосинтетические процессы у растений. Прямое действие связано с активацией работы протонной помпы хлоропластов, косвенное — проявляется в некотором увеличении размера фотосинтетических единиц фотосистемы 2 и количества ее реакционных центров на единицу площади листа, что связано с влиянием гумусовых веществ на белоксинтезирующую систему. Оба пути ведут к увеличению фотоассимиляции CO_2 , фотосинтетической продуктивности и в конечном итоге — урожая (особенно в случае, когда фотосинтетические процессы являются лимитирующими).

Стимулирующее влияние физиологически активных гумусовых веществ на фотосинтез проявлялось эффективнее в случае воздействия на растения неблагоприятных фак-

торов среды. Обработка семян и растений гумусовым препаратом ускорила восстановление фотосинтетических процессов, подавленных гербицидом.

Существует связь между биологическим действием гумусовых веществ и их окислительно-восстановительным состоянием. Более восстановленные гумусовые фракции обладают и более эффективным стимулирующим действием на фотосинтез растений.

Физиологически активные гумусовые вещества из торфа могут служить эффективными экзогенными регуляторами фотосинтетических процессов у растений. К достоинствам гумусовых препаратов, позволяющих использовать их в растениеводстве, относятся простота и дешевизна получения, хороший физиологический эффект (особенно в условиях действия экстремальных факторов), доступный способ применения, отсутствие токсичности. Более эффективное их использование сдерживается из-за отсутствия убедительных данных о конкретной молекулярной структуре, действующем начале гумусовых веществ, вызывающем наблюдаемый физиологический эффект, о том, как и в каком виде они могут поступать внутрь клетки, механизме их действия на растение. Тем не менее гумусовые препараты из торфа с успехом могут применяться (и применяются) в растениеводстве и других отраслях сельского хозяйства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреева А. С., Веселинова Ю. М. Влияние условий адаптации на медленную индукцию флуоресценции в листьях высших растений. — *Биофизика*, 1979, т. 24, вып. 1, с. 175—177.
2. Биофизика фотосинтеза / Под ред. Рубина А. Б. — М.: Изд-во МГУ, 1975.
3. Бобырь Л. Ф. Интенсивность фотосинтеза, состояние электронтранспорт-

ной цепи и активность фосфорилирующей системы под воздействием гуминовых веществ.— Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения. Т. 7. Днепропетровск, 1980, с. 54—63.— 4. *Бобьрь Л. Ф.* Влияние гумусовых веществ на процессы фотосинтеза.— Тр. Междунар. симп. IV и II комиссий МТО. Минск, 1982, с. 159—163.— 5. *Бобьрь Л. Ф., Епишина Л. А.* О связи между окислительно-восстановительным состоянием гумусовых веществ и их биологической активностью.— Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения. Т. 7. Днепропетровск, 1980, с. 41—53.— 6. *Венедиктов П. С., Кренделева Т. Е., Рубин А. Б.* Первичные процессы фотосинтеза и физиологическое состояние растительного организма.— Физиология фотосинтеза. М.: 1982, с. 55—76.— 7. *Гавриленко В. Ф., Ладыгина М. Е., Хандобина Л. М.* Большой практикум по физиологии растений.— М.: Высшая школа, 1975.— 8. *Гиллер Ю. Е., Асоева Л. М.* О действии специфических ингибиторов биосинтеза РНК и белка на процессы миграции энергии в хлоропластах гороха.— Физиол. раст., 1982, т. 29, вып. 2, с. 387—392.— 9. *Григорьев Н. С., Гладышева Е. Е., Морган Н. Ю., Гольд В. М.* Световая зависимость индукционных переходов быстрой и замедленной флуоресценции хлорофилла нативных систем.— Физиол. раст., 1983, т. 30, вып. 2, с. 261—268.— 10. *Иванченко В. М., Маршакова М. И., Избавителев С. П., Кручинина С. С.* Особенности светоиндуцируемых изменений объема изолированных хлоропластов в связи с условиями их инкубации.— Физиол. раст., 1980, т. 27, вып. 4, с. 693—703.— 11. *Ильин Н. П.* Роль фотохимических реакций в образовании почвенного гумуса.— Автореф. канд. дис., М., 1975.— 12. *Кокунин В. А.* Статистическая обработка данных при малом числе опытов.— Укр. биохим. журн., 1975, т. 47, № 6, с. 776—790.— 13. *Корбанюк Р. А., Кравченко Р. Н., Сумина А. Д., Реутов В. А.* Сравнительная характеристика физиологически активных препаратов гумусовой природы методом инфракрасной спектроскопии.— Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения. Т. 7. Днепропетровск, 1980.— 14. *Кукушкин А. К., Караваев В. А.* Теоретиче-

ское исследование влияния эндогенных восстановителей и сложного строения цепи электронного транспорта на кинетику первичных процессов фотосинтеза.— Биофизика, 1980, т. 25, вып. 5, с. 827—831.— 15. *Куперман И. А., Хитрово Е. В.* Дыхательный газообмен как элемент продукционного процесса растений.— Новосибирск: Наука, 1977.— 16. *Куприн С. П., Кукушкин А. К., Тихонов А. Н.* Теоретическое исследование процессов миграции энергии и электронного транспорта в фотосинтезе высших растений.— Биофизика, 1977, т. 22, вып. 2, с. 353—356.— 17. Международный симпозиум IV комиссии МТО (30 августа 1971 г., Рига).— М.: ЦБНТИП, 1973.— 18. *Пивоваров Л. Р.* О природе физиологической активности гуминовых кислот в связи с их строением.— Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения. Т. 2. Киев, 1962, с. 101—121.— 19. *Рубин В. А., Маркарова Е. Н., Веселовский В. А.* Длительное послесвечение как метод ранней диагностики вилта хлопчатника и вирулентности возбудителя.— Методы исследований патологических изменений растений. М., 1976, с. 78—95.— 20. *Станчев Лазар.* Хумусните вещества като биорегулатори в растениеводството.— София, 1977.— 21. *Тооминг Х. Г.* Низкая радиация приспособления — предпосылка формирования фитозенозов и обеспечения их высокой продуктивности.— Физиол. раст., 1983, т. 30, вып. 1, с. 5—22.— 22. *Удовенко Г. В.* Механизм адаптации растений к стрессам.— Физиол. и биохим. культурных растений, 1979, т. 11, № 2, с. 99—107.— 23. *Христева Л. А.* Симулирующее влияние гуминовой кислоты на рост высших растений и природа этого влияния.— Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения. Харьков, 1957, с. 75—93.— 24. *Христева Л. А.* К природе действия физиологически активных гумусовых веществ на растения в экстремальных условиях.— Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения. Т. 7. Днепропетровск, 1977, с. 3—15.—

Статья поступила 15 ноября 1991 г.