

УДК 581.5:535.33:578

О.І. ДАЦЕНКО, В.Р. БОЙКО, О.О. ГРИГОР'ЄВА, М.А. БЕРЕЗОВСЬКА, В.О. ЗУЄВ

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 64, Київ 01601

ОСОБЛИВОСТІ КОНТРОЛЮ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ВОДРОСТЕЙ ЗА НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНИМИ СПЕКТРАМИ ФОТОЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ

Досліджено спектри фотолюмінесценції діатомової водорості *Phaeodactylum tricorutum*, інюльованої вірусом тютюнової мозаїки. При низькій температурі критерій оцінки функціонального стану за загальною інтенсивністю фотолюмінесценції порушується, якщо збудження поглинається не в хлорофілі, а в іншому пігменті – сенсibilізаторі.

Ключові слова: фотолюмінесценція, хлорофіл, водорість, вірус тютюнової мозаїки

Одним з способів контролю за фізіологічним станом рослини є люмінесцентний метод, що полягає в аналізі спектра випромінювання хлорофілу і забезпечує експрес-діагностику стану клітин [6]. Ефективність фотолюмінесценції відображає вміст хлорофілу в хлоропластах, а розвиток фотосинтетичного апарату є показником функціонального стану.

У спектрі емісії хлорофілу спостерігають кілька смуг, кожна з яких відповідає окремому компоненту електротранспортної ланки фотосинтезу [3]. Отже, можна брати до уваги як загальну інтенсивність люмінесценції, так і інтенсивності окремих спектральних смуг. Зокрема, підвищення загальної інтенсивності фотолюмінесценції (ФЛ) відбувається під час вегетації [7], і є підстави вважати його ознакою розвитку рослини, а також показником поліпшення стану. Разом з тим, існує думка про те, що за певних умов збільшення загальної інтенсивності випромінювання хлорофілу слід розглядати як погіршення функціонального стану [6].

У більшості попередніх досліджень [4, 6, 7] ФЛ реєструють при кімнатній температурі. Проте вимірювання спектрів за низьких температур має багато переваг. По-перше, при зниженні температури спрощується реєстрація люмінесценції, оскільки підвищується її ефективність внаслідок зменшення ймовірності процесів безвипромінювальної рекомбінації в молекулах, коли енергія збудження замість випромінювання кванта світла переходить у теплову. По-друге, зменшується ширина спектральних смуг. Ці фактори дозволяють, зокрема, точніше визначати максимуми смуг і з більшою точністю вимірювати їх відносні інтенсивності. Крім того, за низьких температур у спектрі можуть сильніше проявлятися наслідки впливу зовнішніх чинників на організм [2].

Мета роботи – проаналізувати можливість змін критеріїв оцінки функціонального стану за спектрами люмінесценції при низьких температурах.

Матеріал і методи досліджень

Було досліджено спектри ФЛ водорості *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin, інюльованої вірусом тютюнової мозаїки (ВТМ). *P. tricorutum* – морська діатомова водорість, яка широко використовується як модельний об'єкт для різних біологічних досліджень. Крім того, це одна з двох діатомових водоростей, геном яких повністю секвенувано [8]. Вірус тютюнової мозаїки (ВТМ) має широке коло рослин-господарів і легко передається механічним шляхом [9]. Відомо [5], що ВТМ може проникати в клітини зелених водоростей, які філогенетично споріднені з вищими рослинами. Разом з тим відомо [1], що вірусам притаманна висока екологічна пластичність, що дозволяє їм адаптуватися до нових умов навколишнього середовища та знаходити нових господарів.

Для дослідження можливості взаємодії *P. tricorutum* із ВТМ водоростева суспензія була розділена на дві лінії. В одну з ліній було внесено суспензію ВТМ (кінцева концентрація – 200 мкг/мл), друга лінія слугувала контролем. Вік культур, використаних для експерименту, становив 14 діб.

При аналізі спектрів слід враховувати ряд факторів. Наприклад, при зміні температури інтенсивності різних смуг можуть змінюватись по-різному, тому при зниженні температури спектр може змінити форму. Крім того, люмінесценція хлорофілу може бути сенсibilізованою, коли довжина хвилі збуджувального світла знаходиться поза областю поглинання хлорофілу *a*. Тоді поглинання збуджувального світла відбувається не в хлорофілі, а в сенсibilізаторі – іншому

пігменті, котрий згодом передає збудження молекулі хлорофілу, як це часто відбувається в процесі фотосинтезу. Такого типу ФЛ чутливіша до температури, оскільки додатково містить канал передачі енергії збудження.

Для збудження люмінесценції використовувалося два джерела з різними довжинами хвиль: азотний імпульсний лазер ИЛГИ-503 з довжиною хвилі 337 нм і середньою потужністю 3,5 мВт та аргонний лазер неперервної дії ЛГН-402 з довжиною хвилі 488 нм і потужністю 19 мВт. Випромінювання першого джерела здатне поглинатися в хлорофілі *a*, хоча й знаходиться на периферії смуги поглинання, а довжина хвилі випромінювання другого лазера потрапляє у вікно прозорості цього пігменту (поза областю поглинання) і натомість може поглинатися в інших пігментах клітини, наприклад, хлорофілі *b* або каротині. Тому слід очікувати, що в останньому випадку люмінесценція буде сенсифікована.

Результати досліджень і їх обговорення

В спектрі досліджених водоростей загалом спостерігалися дві смуги (рис. 1, 2). При кімнатній температурі найінтенсивнішою була короткохвильова смуга з максимумом на довжині хвилі близько $\lambda_{II} = 682$ нм, поряд із нею спостерігалася смуга з максимумом на $\lambda_I = 708$ нм. Джерелом обох смуг вважають хлорофіл *a*: першу смугу відносять до випромінювання молекул, що знаходяться в фотосистемі (ФС) II, другу пов'язують з молекулами ФС I. Форма довгохвильового крила спектральної кривої дозволяє припустити присутність у спектрі щонайменше ще однієї смуги в околі λ 740 нм.

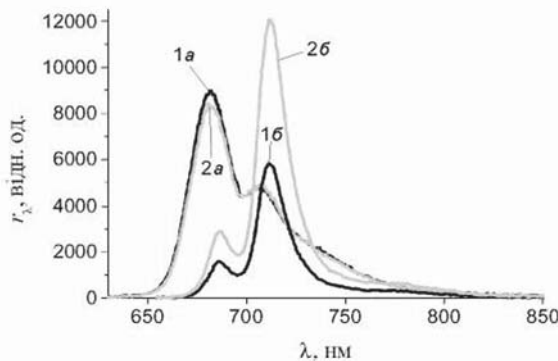


Рис. 1. Спектри ФЛ контрольної (1) та інокульованої (2) культури *Phaeodactylum tricornutum* при 300К (а) та 80К (б). Збудження 488 нм.

Дані, отримані у випадку непрямого збудження центрів люмінесценції (молекул хлорофілу *a*), наведені на рис. 1. Можна бачити, що люмінесценція зразка, інокульованого вірусом, мало відрізняється від люмінесценції контрольної як за загальною інтенсивністю, так і за формою спектра. Відмінність полягає лише в невеликому зменшенні інтенсивності смуги λ_{II} . Вважається, що ФС II рослини більш чутлива до зовнішнього впливу, тому показником функціонального стану часто обирають відношення інтенсивностей спектральних смуг хлорофілу $f = I(\lambda_{II}) / I(\lambda_I)$ [3]. Зменшення цього відношення трактується відповідно як погіршення функціонального стану, що ми, власне, й спостерігали після обробки культури вірусом.

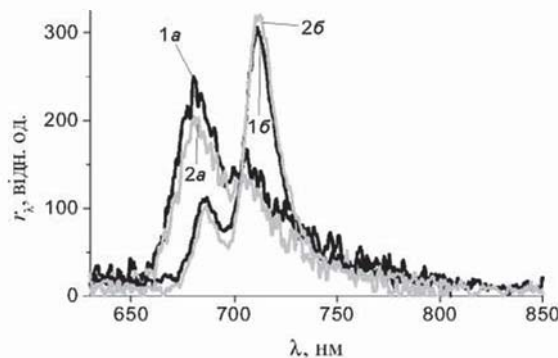


Рис. 2. Спектри ФЛ контрольної (1) та інокульованої (2) культури *Phaeodactylum tricornutum* при 300К (а) та 80К (б). Збудження 337 нм.

Результати, отримані при збудженні в області поглинання хлорофілу *a*, наведені на рис. 2. При кімнатній температурі вони в межах похибки (на рівні шумів) і подібні до наведених на попередньому рисунку. При охолодженні рідким азотом до 80 К склад спектрів залишився таким же, як і за нормальних умов, хоча в спектрі починає домінувати смуга λ_1 . Крім того, смуги дещо звужуються і зазнають довгохвильового зсуву, так що максимум смуги λ_{II} тепер знаходиться на довжині хвилі 685 нм, а смуга λ_1 розташована на відмітці 712 нм.

При прямому збудженні центрів люмінесценції, якими є молекули хлорофілу *a*, дані контрольного та інокульованого вірусом зразків за низьких температур також подібні (рис. 2): відношення *f* у спектрі для останнього теж дещо зменшене, а загальна інтенсивність люмінесценції змінюється мало. Коли ж збудження відбувається в іншому пігменті (рис. 1), інтенсивність ФЛ зараженої культури виявляється суттєво вищою, ніж у контрольного зразка, хоча, проноормувавши спектри на максимум, неважко переконатися, що тенденція до зменшення відношення *f* зберігається. Зазначимо, що у разі зміни довжини хвилі збудження з 337 нм на 488 нм це відношення теж дещо зменшується.

Висновки

Метод контролю функціонального стану рослини за інтенсивністю низькотемпературної фотолюмінесценції хлорофілу має свої особливості. Коли люмінесценція сенсibilізована, тобто збуджувальне світло поглинається не в центрах емісії, ефективність випромінювання організму з гіршим функціональним станом може виявитись вищою, ніж у рослини, що перебуває в кращому стані. Натомість інша ознака пригнічення рослини – зменшення відношення *f* інтенсивностей смуг спектра – зберігається.

Причиною збільшення інтенсивності низькотемпературної люмінесценції зараженої культури в порівнянні з контролем ми вважаємо появу у культурі, інокульованій вірусом, додаткового сенсibilізаційного центра, де, як і в основному сенсibilізаторі, лазерне збудження з довжиною хвилі 488 нм ефективно поглинається і передається далі хлорофілу *a*, на відміну від ультрафіолетового випромінювання. Особливістю нового сенсibilізатора є те, що він активний лише за низьких температур.

1. Бойко А.Л. Экология вирусов растений / А.Л. Бойко. – К.: Вища шк., 1990. – 116 с.
2. Вакуленко О.В. Люминесцентный контроль функционального состояния *Vallisneria spiralis* L., облученной микроволновой радиацией / О.В. Вакуленко, О.О. Григорьева, А.И. Даценко // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2010. – Т. 50, № 2. – С. 211–216.
3. Веселовский В.А. Люминесценция растений: Теоретические и практические аспекты / Веселовский В.А., Веселова Т.В. – М.: Наука, 1990. – 200 с.
4. Карнаухов В.Н. Люминесцентный анализ клеток / В.Н. Карнаухов. – Пушкино, 2002. – 131 с.
5. Про можливість штучного ураження ґрунтової водорості *Bracteacoccus minor* (Chodat) Petrova (Chlorophyta) вірусом тютюнової мозаїки / В.Р. Бойко, І.Ю. Костіков, Н.А. Сенчугова [та ін.] // Вісн. Запорізького держ. ун-ту. – Запоріжжя, 2004. – № 1. – С. 33–39.
6. Рубин А.Б. Биофизические методы в экологическом мониторинге / А.Б. Рубин // Биология. – 2000. – С. 7–13.
7. Фатеева Н.Л. Дистанционная диагностика состояния растений на основе метода лазерно-индуцированной флуоресценции: автореф. дис. на соискание уч. степени канд. физ.-мат. наук / Н.Л. Фатеева. – Новосибирск: Институт оптики атмосферы имени академика В.Е. Зуева Сибирского отделения РАН, 2007.
8. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes / C. Bowler, A. Allen, J. Badger [et al.] // Nature. – 2008. – Vol. 456. – P. 239–244.
9. Virus Taxonomy. VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses / C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff [et al.]. – Academic Press, 2005. – 1162 p.

О.І. Даценко, В.Р. Бойко, О.О. Григорьева, М.А. Березовская, В.О. Зуев
Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, Украина

ОСОБЕННОСТИ КОНТРОЛЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ВОДОРΟΣЛЕЙ ПО НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫМ СПЕКТРАМ ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Исследованы спектры фотолюминесценции диатомовой водоросли *Phaeodactylum tricoratum*, инокулированной вирусом табачной мозаики. При низкой температуре критерий оценки функционального состояния по общей интенсивности фотолюминесценции нарушается, если возбуждение поглощается не в хлорофилле, а в другом пигменте – сенсibilизаторе.

Ключевые слова: фотолюминесценция, хлорофилл, водоросль, вирус табачной мозаики

O.I. Datsenko, V.R. Boyko, O.O. Grigor'eva, M.A. Berezovska, V.O. Zuev
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

FEATURES OF CONTROL OF THE FUNCTIONAL STATE OF ALGAE ARE AFTER THE LOW TEMPERATURE SPECTRUMS OF PHOTOLUMINESCENCE

Photoluminescence spectra of the *Phaeodactylum tricoratum* diatom alga inoculated by the tobacco mosaic virus are measured. The estimation criterion of the functional state by the total photoluminescence intensity is transgressed at the low temperatures if the excitation light is absorbed at the sensitizer pigment rather than at the chlorophyll.

Key words: photoluminescence, chlorophyll, alga, virus of tobacco mosaic

УДК 574.5

Н.В. ДЕРЕЗЮК

Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова
вул. Маяковського, 7, Одеса 65082

ОСОБЛИВОСТІ РОЗВИТКУ ФІТОПЛАНКТОНУ В ПРИБЕРЕЖНИХ ВОДАХ О. ЗМІЙНИЙ (2003-2009 рр.)

Досліджено видовий склад та кількісні характеристики фітопланктону, який розвивався на прибережній акваторії о. Зміїний. По даним 2009 р. був виконаний аналіз просторового та вертикального розподілу основних характеристик мікроводоростей.

Ключові слова: фітопланктон, о. Зміїний, біомаса, індекс Шенона, просторовий розподіл, вертикальний розподіл

Актуальність досліджень альгофлори полягає в комплексній оцінці морської екосистеми українського шельфу, особливо в контактних районах. Особливості прибережних вод о. Зміїний визначаються періодичним впливом Дунайського стоку, що створює умови для розвитку окремих видів та угруповань фітопланктону, за допомогою яких можна оцінювати якість вод р. Дунай.

Метою дослідження було вивчення видового складу фітопланктону, його кількісних характеристик та просторового розподілу на прибережній акваторії для оцінки сучасного стану біоти о. Зміїний.

Матеріал і методи досліджень

В основу дослідження покладені дані моніторингу, проведеного в 2003-2009 рр. на постійній станції (причал, глибина 8 м), та на прилеглій акваторії. Зразки фітопланктону відбирали регулярно кожні 5 (у 2003-2008 рр.) та 10 діб (у 2009 рр.). В 2009 р. були проведені щосезонні обстеження прибережної акваторії на відстані 5-530 м від берегу, що відповідало глибинам 1-30 м: у квітні, липні та в жовтні-листопаді. Зібрано більше 1000 проб фітопланктону.

Концентрування проб фітопланктону проводили методом осадження, в якості консерванту був використаний формалін [6]. Камеральна обробка проб фітопланктону була проведена за допомогою мікроскопів БІОЛАМ Р-12, МІКМЕД-2 та HUND-H600. Розрахунки об'єму клітин мікроводоростей, сумарної чисельності та біомаси виконані з застосуванням програми «TRITON»[®], індекс видової різноманітності розраховували за формулою Шенона [1, 7, 9].

Результати досліджень та їх обговорення

Протягом семирічного періоду досліджень в прибережних водах о. Зміїний зареєстровано більше 300 видів мікроводоростей 8 таксономічних відділів: *Bacillariophyceae*, *Dinophyceae*, *Chlorophyceae*, *Cyanophyceae* (*Cyanobacteria*), *Cryptophyceae*, *Chrysophyceae*, *Euglenophyceae*, *Ebriophyceae* [8]. Зазвичай спостерігали три сезонні максимуми в розвитку фітопланктону – навесні, влітку і восени. В зимовий період (з грудня до березня) спостереження не проводили.

Встановлено, що річковий стік Дунаю є головним чинником, що впливає на особливості розвитку фітопланктону – різноманітність видового складу, а також на щільність мікроводоростей в прибережній акваторії о. Зміїний, головню, у весняно-літній період [2-4]. У багатоводні роки у