

DOI: 10.5281/zenodo.3590255

УДК: 632.112

## ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ-СПЕКТРАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ РАСТЕНИЙ В СВЯЗИ С ИХ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ЗАСУХЕ И ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

*Виктория КРИВОШАПКА, Олег КИТАЕВ*

*Институт садоводства Национальной академии аграрных наук Украины*

**Abstract.** The authors present the results of the plants functional state estimation in relation to their resistance to a complex of abiotic factors. A new methodological approach for estimating plant drought- and heat- resistance has been proposed on the basis of the comparative analysis of the water and physical parameters of leaves by applying the methods of the chlorophyll fluorescence photo- and thermoinduction. The determination of the plants functional state using the proposed methods may be applied in the breeding work and in agriculture on the whole, in particular, in horticulture and irrigated agriculture when normalizing irrigation.

**Key words:** Chlorophyll fluorescence; Chloroplasts; Drought; Heat; Leaves; Photoluminescence; Thermoluminescence; Water deficit.

**Реферат.** Представлены результаты исследований функционального состояния растений в связи с их устойчивостью к комплексу абиотических факторов. Предлагается новый методический подход для оценки засухо- и термоустойчивости на основе сравнительного анализа водных и физических параметров листьев с применением методов фото- и термоиндукции флуоресценции хлорофилла. Определение функционального состояния растений с использованием предложенных методов может быть применено в селекционной работе, сельском хозяйстве в целом, в частности садоводстве и орошаемом земледелии при нормировании орошения.

**Ключевые слова:** Флуоресценция хлорофилла; Хлоропласт; Засуха; Жара; Листья; Фотолюминесценция; Термолюминесценция; Водный дефицит.

### ВВЕДЕНИЕ

Плодовые и ягодные культуры в процессе выращивания могут подвергаться действию различных абиотических факторов (мороз, засуха и др.), что влияет на их функциональное состояние. В связи с глобальным потеплением особенно актуальным становится изучение адаптации растений к изменению климата, их устойчивости к недостатку влаги и к высоким температурам.

В настоящее время используются полевой и лабораторно-полевой методы оценки засухоустойчивости культур, но они довольно трудоемки. Поэтому важно разрабатывать новые или совершенствовать существующие методы для диагностики адаптивности растений к действию высоких температур (засуха, жара).

Ряд авторов отмечает, что в экстремальных условиях чаще всего нарушается фотосинтез в листьях. Характер изменений на его первоначальных стадиях непосредственно проявляется в процессе флуоресценции хлорофилла в фотосинтетических мембранах клеток, или так называемой индукции флуоресценции хлорофилла. Она позволяет исследовать в живых объектах протекание фотохимических реакций, связанных с работой фотосистемы II высших растений - системы, наиболее чувствительной к факторам внешней среды, таких как экстремальные температуры, избыточная освещенность, высушивание, повышенное содержание солей в питательной среде (Брайон, О.В. et al. 2000; Китаев, О.И. 1983; Полевой, В.В. 1989).

Важным преимуществом метода индукции флуоресценции хлорофилла является то, что в ходе исследований объект не повреждается, оценка проводится быстро, появляется возможность автоматизировать измерения и тем самым повысить эффективность работы, ускорить внедрение ее результатов в практику.

Цель наших исследований заключалась в разработке метода, который позволил бы без нарушений целостности объекта контролировать его функциональное состояние и изменения под действием факторов окружающей среды, прежде всего водного режима и высоких температур.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты были проведены в лаборатории физиологии растений и микробиологии ИС НААН Украины. Объектами служили 7 сортов вишни отечественной и зарубежной селекции.

Засухоустойчивость растений определяли лабораторно - полевым методом: проводили изучение водного режима листьев, а именно их способность удерживать воду и восстанавливать тур-

гор, оводненность тканей и водный дефицит. Для определения устойчивости к высоким температурам изучали жаростойкость листьев (Бублик, М.О. et al. 2010; Кушнirenко, М.Д., Курчатова, Г.П. et al. 1975; Седов, Е.Н., Огольцова, Т.П., ред. 1999; Скрыга, В.А. et al. 2005).

Исследовали фото- и термоиндукцию флуоресценции хлорофилла на живых листьях с помощью лабораторного микроспектрофлуориметра СМФ-2р, определяя степень устойчивости конкретного растения к засухе и жаре (Китаев, О.И. 1983; Скрыга, В.А., Бублик, М.О. et al. 2005; Скрыга, В.А., Бублик, М.О. et al. 2006). Флуоресценцию возбуждали, облучая лист синим светом в диапазоне волн от 400 до 500 нм, и регистрировали зависимость флуоресценции от температуры (от 650 до 770 нм). Устанавливали максимальное и стационарное значение ее индукции, а также максимумов волн ее термоиндукции при изменении температуры от 20 до 70 °С.

Основной задачей была разработка метода, который на основе измерений физических показателей, в частности характерных значений индукции флуоресценции и термоиндукции хлорофилла, позволит с минимальными затратами труда и времени надежно диагностировать засухо- и жаростойкость растений. Регистрировали следующие показатели: максимальное ( $F_m$ ) и стационарное ( $F_{st}$ ) значения индукции флуоресценции, а также максимумов ее термоиндукции в диапазонах температур 20 - 35 °С ( $F_\alpha^t$ ), 35 - 45 °С ( $F_\beta^t$ ) и 45 - 70 °С ( $F_\gamma^t$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Известно, что дефицит влаги влияет на такие процессы, как поглощение воды, корневое давление, фотосинтез, дыхание, транспирация, рост и развитие и тому подобное. Действие водного дефицита на метаболизм в значительной степени зависит от его продолжительности. В условиях засухи снижается содержание белков в листьях, а также наблюдается уменьшение количества всех форм сахаров (Полевой, В.В. 1989; Шишкану, П.В. 1973). Засушливая погода вызывает снижение прироста побегов и корней, ослабление развития листового аппарата, а также нарушение ассимиляции  $CO_2$  и уменьшение накопления запасных питательных веществ, ухудшает качество и лежкость плодов. Ряд авторов (Еремеев, Г.Н. 1960; Полевой, В.В. 1989) отмечает, что недостаток влаги в почве и высокие температуры угнетают фотосинтез и становятся причиной функциональных заболеваний. Вот почему всестороннее изучение реакции плодовых и ягодных пород и их сортов на засуху с целью оценки их чувствительности к ней является одной из важнейших задач физиологии в плодоводстве.

В исследованиях параллельно с изучением степени устойчивости конкретного сорта к засухе и высоким температурам анализировали способность листьев удерживать воду, восстанавливать тургор оценивали водный дефицит, оводненность тканей проводили микроспектральное определение фото- и термоиндукции флуоресценции хлорофилла (табл. 1). Перед измерением осуществляли темновую адаптацию листа. Это необходимо для приведения системы фотосинтеза в исходное состояние и для получения однозначных сигналов максимальной и стационарной флуоресценции. Продолжительность адаптации (от 3 до 120 мин.) влияет на точность определения максимальной ( $F_m$ ) и стационарного ( $F_{st}$ ) значений флуоресценции, особенно при облучении листьев с интенсивностью ниже, чем насыщающая. В нашем случае стационарное значение ( $F_{st}$ ) использовали для определения начала нагрева листа с последующей регистрацией термоиндукции. Для надежной фиксации стационарной флуоресценции необходимо облучение листа в течение не менее 3 мин.

С достижением стационарного уровня ( $F_{st}$ ) начинали нагрев листьев (их освещенные зоны с постоянной скоростью повышения температуры в пределах 8 - 10 °С / мин.) и измерение термоиндукции флуоресценции. При нагревании появляются так называемые волны термоиндукции. Каждая из них вызвана определенными физиологическими процессами и проявляется в определенном диапазоне температур, например в диапазоне от окружающей температуры до 35 °С (до 90 сек.) возникает  $\alpha$  - волна, связанная с влиянием водного и светового режима на фотосинтетические реакции. Но повышение  $F_\alpha^t$  может быть вызвано как увеличением дефицита влаги в листьях, так и переувлажнением почвы. Поэтому только одновременный рост  $F_{st}$  и  $F_\alpha^t$  и учет обоих этих показателей при определении дефицита влажности листка можно однозначно трактовать как его увеличение. Кроме того, индикатором оптимальной оводненности может быть  $F_\alpha^t \leq F_{st}$ .

В результате изучения водного режима листьев было установлено, что наиболее тесно с амплитудой  $F_\alpha^t$  ( $\alpha$  - волна) коррелируют показатели их водного дефицита. Через 24 часа после на-

сыщения листов низкий водный дефицит был зафиксирован у Чудо-вишни (27%), высокий - у Норд Стара и Тургеневки (соответственно 41 и 47%). У сортов Ребатская красавица, Фаворит, Донецкий великан и Ночка этот показатель колебался в пределах 30 - 35%.

**Таблица 1. Показатели функциональной активности и водного дефицита листьев сортов вишни**

Сорт	$F_m$ , від.од.*	$F_{st}$ , від.од	$F'_a$ , від.од	$F'_a$ , %	Водный дефицит, %
Чудо-вишня	313	59,5	7,0	11,8	27
Фаворит	253	50,6	5,7	11,3	31
Тургеневка	208	33,3	7,2	21,6	47
Донецкий великан	288	57,6	7,1	12,3	35
Ребатская красавица	272	51,7	9,2	16,1	30
Ночка	212	38,2	5,5	14,4	32
Норд Стар	176	35,2	5,6	15,9	41
НІР <sub>05</sub>	37	7,0	1,0	2,2	5,2

\* Относительные единицы.

При проведении комплексной оценки устойчивости сортов вишни к засухе установлена высокая коррелятивная зависимость ( $r = 0,81$ ) между показателями водного дефицита и параметром термоиндукции флуоресценции хлорофилла листьев ( $F'_a$  в процентах от  $F_{st}$ ), характеризующим напряженность электрон - транспортных процессов между реакционными центрами фотосистем хлоропластов. Это позволило с минимальными затратами труда и времени без использования контрольных растений надежно определить водный дефицит листьев, то есть диагностировать засухоустойчивость растений по функциональным показателям.

После возникновения  $\alpha$  - волны появляются волны термоиндукции  $\beta$  - и  $\gamma$ , которые обусловлены последовательным отторжением антенных и светособирающих комплексов от реакционных центров ФС2 и могут характеризовать устойчивость растений к высоким температурам. При использовании в качестве объектов сортов вишни установлено, что температура возникновения волн флуоресценции  $\beta$  и  $\gamma$  прямо опосредована стабильностью функционирования пигментных комплексов вблизи реакционных центров фотосистемы 2. Высокие температуры появления  $\beta$  и прежде всего  $\gamma$  - волны флуоресценции свидетельствуют о большей термостабильности хлоропластов и жаростойкости листового аппарата в целом (Ночка и Альфа - 62,4-63,4оС). У сорта Донецкий великан этот показатель был более низкий - 56,4 оС.

Таким образом, высокотемпературные волны флуоресценции, прежде всего температура их появления, характеризуют термостабильность пигментного комплекса хлоропластов, который играет значительную роль в засухо - и жаростойкости листового аппарата и растения в целом.

Температурные изменения при нагреве листьев являются чувствительным показателем структурного и функционального состояния пластидного комплекса, обусловленного сортовыми особенностями плодовых растений и условиями их выращивания, и могут служить тестом для быстрой оценки степени их засухо - и жаростойкости.

## ВЫВОДЫ

Проведено сравнительное изучение реакции фотосинтетического аппарата растений на действие засухи и высокой температуры с применением методов фото- и термоиндукции флуоресценции хлорофилла листьев.

Определение первичных фотосинтетических процессов в хлоропластах листьев позволяет диагностировать жаро- и засухоустойчивость растений, поскольку влияние дефицита влаги и температуры устанавливают путем наблюдений за функциональными изменениями фотосинтеза.

Выявлено, что параметр термоиндукции флуоресценции хлорофилла  $F'_a$ , характеризующий напряженность в течение электрон - транспортных процессов между реакционными центрами фотосистем хлоропластов, тесно коррелирует с водным дефицитом.

Высокотемпературные волны флуоресценции хлорофилла и, прежде всего температура, при появлении  $\gamma$  – волны, характеризует термостабильность пигментного комплекса, определяющего жаростойкость листьев и растения в целом.

Анализ показал, что среди сортов, которые изучались, высокой засухоустойчивостью отличались Чудо-вишня и Ребатская красавица, средней - Ночка, Донецкий великан и Фаворит, низкой - Норд Стар и Тургеневка.

Способ определения функционального состояния растений по изменениям фотоиндуцированной флуоресценции хлорофилла и его термоиндукции может быть применен в селекционной работе, сельском хозяйстве в целом, в частности садоводстве и орошаемом земледелии при нормировании орошения.

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. БРАЙОН, О.В., КОРНЕЄВ, Д.Ю., СНЕГУР, С.С., КИТАЄВ, О.І. (2000). Інструментальне вивчення фотосинтетичного апарату за допомогою індукції флуоресценції хлорофілу: методичні вказівки для студентів біологічного факультету. Київ. 25 с.
2. БУБЛИК, М.О., СКРЯГА, В.А., КИТАЄВ, О.І. (2010). Особливості визначення адаптивного потенціалу сортів вишні до жару та посухи. В: Бюл. Інституту зернового господарства. Дніпропетровськ, № 39, с. 173-176.
3. ЕРЕМЕЕВ, Г.Н. (1960). Некоторые физиологические показатели стойкости к засушливым условиям плодовых и других древесно-кустарниковых растений. Москва.
4. КИТАЄВ, О.І. (1983). Дослідження функціональних порушень пластидного апарату рослин абрикоса при надмірній вологості ґрунту люмінесцентно-спектральними методами. В: Садівництво, вип. 31, с. 69-71. ISSN 0558-1125.
5. КУШНИРЕНКО, М.Д., КУРЧАТОВА, Г.П., КРЮКОВА, Е.В. (1975). Методы оценки засухоустойчивости плодовых растений. Кишинев: Штиинца, 1975. 24 с.
6. ПОЛЕВОЙ, В.В. (1989). Физиология растений. Москва: Высшая школа, 1989. 464 с.
7. СЕДОВ, Е.Н., ОГОЛЬЦОВА, Т.П., ред. (1999). Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур. Орел, 1999. 608 с.
8. СКРЯГА, В.А., БУБЛИК, М.О., МОЙСЕЙЧЕНКО, Н.В., КИТАЄВ, О.І. (2005). Комплексна оцінка посухо- та жаростійкості сортів вишні в північному Лісостепу України. В: Садівництво, 2005, вип. 57, с. 480-486. ISSN 0558-1125.
9. СКРЯГА, В.А., БУБЛИК, М.О., МОЙСЕЙЧЕНКО, Н.В., КИТАЄВ, О.І. (2006). Оцінка продуктивності сортів вишні на основі показників функціональної активності листового апарату. В: Садівництво, вип. 58, с. 167-174. ISSN 0558-1125.
10. ШИШКАНУ, П.В. (1973). Фотосинтез яблони. Кишинев: Штиинца. 291 с.

### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**КРИВОШАПКА Виктория**, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник, зав. лабораторией физиологии растений и микробиологии, Институт садоводства (ИС) Национальной академии аграрных наук Украины, Киев, Украина

**КИТАЕВ Олег**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Институт садоводства (ИС) Национальной академии аграрных наук Украины, Киев, Украина

*Corresponding author: o\_kitaev@i.ua*

Received: 12 July 2019

Accepted: 14 September 2019