

Мониторинг чувствительности растений к физиологически активным веществам и стрессовым факторам флуоресцентными методами

© О.А. Калмацкая¹, Е.И. Гунар², А.В. Малоземова¹, В.А. Караваев¹

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Россия

² Российский государственный аграрный университет — Московская сельскохозяйственная академия имени
К.А. Тимирязева,
127550 Москва, Россия

e-mail: kalmackaya@physics.msu.ru

Поступила в редакцию 01.12.2023 г.

В окончательной редакции 17.01.2024 г.

Принята к публикации 05.03.2024 г.

Исследованы индукционные изменения флуоресценции листьев растений картофеля и бархатцев после обработки клубней (картофель) и опрыскивания вегетирующих растений (бархатцы) препаратом „Эпин-Экстра“ и кремнийсодержащим жидким органическим удобрением „Силиплант“. Использование этих препаратов позволило компенсировать негативные воздействия на фотосинтетический аппарат растений, связанные с обработкой клубней картофеля фунгицидом „Максим“, а также выдерживанием растений бархатцев при температуре 5°C в течение трех суток.

Ключевые слова: картофель, бархатцы, фунгициды, эпин, силиплант, флуоресценция хлорофилла.

DOI: 10.61011/OS.2024.04.58213.27-24

Введение

Флуоресцентные показатели фотосинтезирующих объектов зависят от широкого круга биотических и абиотических факторов и являются весьма привлекательными для оценки структурно-функциональной организации фотосинтетического аппарата растений [1–4]. Наибольший интерес представляют индукционные изменения флуоресценции, наблюдаемые после кратковременного периода темноты и отражающие регуляторные изменения фотосинтеза. Ранее было показано, что относительные изменения показателя $(F_M - F_T)/F_T$ медленной индукции флуоресценции (МИФ) (степень тушения флуоресценции в индукционном периоде) соответствуют относительным изменениям фотосинтетической активности растений, оцениваемой по скорости газообмена в расчете на хлорофилл [5,6]. Метод МИФ был успешно применен для изучения функциональной активности фотосинтетического аппарата растений, находящихся в различных физиологических условиях [7–9]. Получение дополнительных сведений об информационных возможностях флуоресцентных показателей растений, находящихся в различных физиологических условиях, представляется важным и актуальным.

В настоящей работе исследованы флуоресцентные показатели растений картофеля и бархатцев после обработки клубней (картофель) и вегетирующих растений (бархатцы) препаратами „Эпин-Экстра“ и „Силиплант“. „Эпин-Экстра“ (действующее вещество — эпин — эбибрассинолид — фитогормон стероидной природы) достаточно широко используется в растениеводстве. Применяется

для усиления роста и развития растений, повышения устойчивости к неблагоприятным факторам внешней среды, в том числе холодному стрессу, а также для формирования у растений хозяйственно-ценных признаков. „Силиплант“ — кремнийсодержащее жидкое органическое удобрение, повышает эффективность гербицидов и снижает их фитотоксичность по отношению к культуре. Ранее было показано стимулирующее действие этих препаратов на фотосинтетическую активность и урожайность сельскохозяйственных культур [10,11].

Задачи, решавшиеся в работе, имеют важное прикладное значение.

1. В семенном картофелеводстве распространен прием обработки клубней фунгицидами при хранении и перед посадкой [12]. Вместе с тем известно, что такая обработка может привести к ухудшению биохимических показателей и снижению продуктивности картофеля следующей репродукции [13]. В связи с этим предполагалось выяснить, может ли обработка клубней защитно-стимулирующими средствами биологической природы компенсировать негативное последствие фунгицидов на фотосинтетический аппарат растений, выращенных из этих клубней.

2. Декоративные растения бархатцев широко используются в городском ландшафтном дизайне. Они достаточно устойчивы к неблагоприятным условиям и характеризуются активным цветением с раннего лета и до поздней осени. В настоящей работе предполагалось выяснить, может ли обработка бархатцев физиологически активными веществами повысить их устойчивость к

пониженным температурам и продлить, таким образом, период их вегетации.

Поставленные в работе задачи решали с использованием флуоресцентных показателей растений, отражающих функциональную активность фотосинтетического аппарата. При регистрации флуоресценции листьев картофеля использовали однолучевую схему, при которой достаточно интенсивный возбуждающий флуоресценцию свет инициирует соответствующие индукционные изменения первичных процессов фотосинтеза, зависящие от окислительно-восстановительного состояния переносчиков электронов между двумя фотосистемами (ФС), градиента протонов на мембране тилакоидов и характера распределения энергии возбуждения между ФС [1,2]. Одним из механизмов, влияющих на интенсивность флуоресценции хлорофилла, является перемещение хлоропластов внутри клетки (так называемый эффект „разбегания“ хлоропластов под действием достаточно интенсивного света) [14]. В случае бархатцев использовали импульсный флуорометр, в схеме которого флуоресценция хлорофилла, возбуждаемая слабым измерительным светом, отражает изменения, вызванные интенсивным действующим (актиничным) светом. Подобная схема, в которой используются также мощные насыщающие импульсы света, позволяет оценить квантовую эффективность фотохимических превращений в ФС2, а также определить коэффициенты фото- и нефотохимического тушения флуоресценции в индукционном периоде [15].

1. Объекты и методы

Объектами исследований являлись растения картофеля *Solanum tuberosum* и бархатцев *Tagetes patula* L. Перед хранением клубни картофеля обрабатывали фунгицидом „Максим“ и препаратами „Эпин-Экстра“ и „Силиплант“ в рекомендованных дозах. По окончании срока хранения клубни высаживали в вегетационном и полевом опытах. Для регистрации флуоресценции листья растений отделяли от стебля, помещали в специальный держатель и выдерживали в темноте в течение 5 минут для стандартизации условий эксперимента. После этого лист освещали широкополосным синим светом интенсивностью около 100 W/m^2 ; флуоресценцию регистрировали на длине волны 686 nm . В качестве параметра МИФ использовали отношение $(F_M - F_T)/F_T$, где F_M — максимальное значение интенсивности флуоресценции, достигаемое примерно через 20 с освещения, а F_T — стационарный уровень флуоресценции, достигаемый через 10–15 мин освещения.

Растения бархатцев опрыскивали водными растворами препаратов „Эпин-Экстра“ (концентрация 0.2 ml/l) и „Силиплант“ (3 ml/l) в фазу активного цветения; контрольные растения опрыскивали водой. На следующий день после обработки контейнеры с растениями помещали в холодильник и выдерживали там при температуре 5°C в течение трех суток. Еще одну

партию растений, обработанных водой, в это время выдерживали в условиях существенного затенения при комнатной температуре. Кинетику флуоресценции хлорофилла в листьях бархатцев измеряли с помощью импульсного флуорометра РАМ-2500 (фирма Вальц, Германия). Высечку из листа помещали в держатель и выдерживали в темноте в течение 5 min. Протокол измерений флуоресценции представлен на рисунке. Флуоресценцию возбуждали импульсным измерительным светом ($\lambda = 630 \text{ nm}$, $\Delta\lambda = 5 \text{ nm}$, $I = 10 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$; сразу после включения измерительного света определяли исходный уровень флуоресценции F_0 . Максимальный уровень F_m определяли при освещении листа насыщающей вспышкой света ($\lambda = 630 \text{ nm}$, $\tau = 0.5 \text{ ms}$, $I = 3400 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Индукционные изменения флуоресценции наблюдались при включении действующего света ($\lambda = 455 \text{ nm}$, $I = 150 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$); насыщающие вспышки света следовали с интервалом в 20 s. В качестве параметров определяли: $\Phi_{\text{PSII}} = (F_m - F)/F'_m$ (характеризует эффективный квантовый выход ФС2) и $\Phi_{\text{NPQ}} = (F_m - F'_m)/F'_m$ (коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции); эти показатели определяли после выхода флуоресценции на стационарный уровень F_T . Рассчитывали также отношение $(F_M - F_T)/F_T$.

2. Результаты и обсуждение

2.1. Опыты с картофелем

В вегетационном опыте наблюдалось уменьшение по сравнению с контролем показателя $(F_M - F_T)/F_T$ МИФ листьев растений, выращенных из клубней, обработанных фунгицидом, и увеличение этого показателя для всех вариантов с применением иммуномодуляторов (в наибольшей степени — для смеси „Максима“ с препаратом „Эпин-Экстра“) (табл. 1).

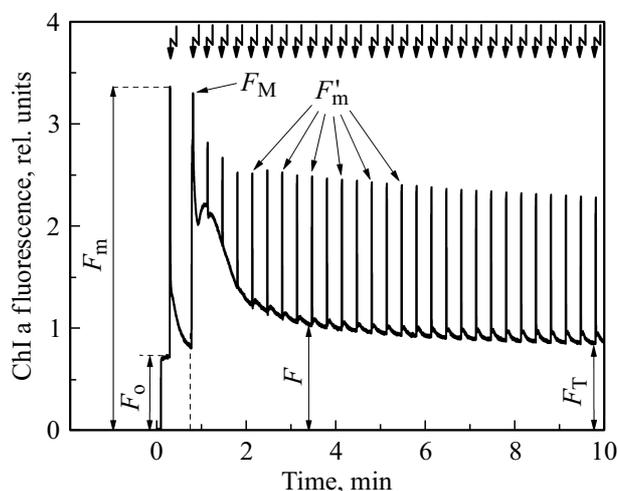
Эти данные свидетельствуют о повышении функциональной активности фотосинтетического аппарата растений при использовании иммуномодуляторов. Существенно, что различия в фотосинтетической активности, установленные методом МИФ для разных вариантов обработки клубней, соответствовали различиям в урожайности картофеля следующей репродукции (табл. 1). Так, наименьшие значения показателя $(F_M - F_T)/F_T$ МИФ и наименьшая урожайность наблюдались в варианте обработки клубней фунгицидом „Максим“, а наибольшие значения $(F_M - F_T)/F_T$ и наибольшая урожайность — в варианте обработки смесью фунгицида и эпина. Установлена высокая положительная корреляция между значениями $(F_M - F_T)/F_T$ МИФ растений, зарегистрированными в вегетационном опыте, и урожайностью картофеля в полевом опыте. Коэффициент корреляции для $n = 6$ пар значений, приведенных в таблице, составил $r = 0.95$, корреляция достоверна с вероятностью $p > 0.999$.

Таблица 1. Флуоресцентные показатели листьев картофеля после обработки клубней фунгицидом „Максим“ и препаратами „Эпин-Экстра“ и „Силиплант“ и урожайность картофеля следующей репродукции (в столбце для $(F_M - F_T)/F_T$ указаны стандартные отклонения)

Варианты обработки клубней	$(F_M - F_T)/F_T$ (вегетационный опыт)	Урожайность, t/ha, НСР ₀₅ 0.2 (полевой опыт)
Контроль	0.38 ± 0.03	32.5
„Максим“	0.31 ± 0.02	29.0
„Эпин-Экстра“	0.44 ± 0.02	32.4
„Силиплант“	0.43 ± 0.02	33.4
1/2 „Максим“ + „Эпин-Экстра“	0.58 ± 0.03	41.8
1/2 „Максим“ + „Силиплант“	0.56 ± 0.03	39.6

Таблица 2. Флуоресцентные показатели растений бархатцев, обработанных препаратами „Эпин-Экстра“ и „Силиплант“: Φ_{PSII} (± 0.005), NPQ (± 0.02), $(F_M - F_T)/F_T$ (± 0.05) (указаны максимальные стандартные отклонения)

Вариант обработки	До охлаждения			После охлаждения		
	Φ_{PSII}	NPQ	$(F_M - F_T)/F_T$	Φ_{PSII}	NPQ	$(F_M - F_T)/F_T$
Вода	0.530 (100%)	0.60 (100%)	1.75 (100%)	0.465 (88%)	0.54 (90%)	1.50 (86%)
„Эпин-Экстра“	0.520 (100%)	0.59 (100%)	2.10 (100%)	0.515 (99%)	0.63 (107%)	2.05 (98%)
Силиплант	0.520 (100%)	0.54 (100%)	1.80 (100%)	0.520 (100%)	0.59 (109%)	1.85 (103%)



Протокол измерений флуоресценции с помощью РАМ-флуорометра. Зигзагообразными стрелками указаны моменты включения насыщающих вспышек света.

2.2. Опыты с бархатцами

У контрольных растений бархатцев, выдержанных в темноте при низкой температуре, наблюдалось достоверное снижение всех измерявшихся флуоресцентных показателей (табл. 2). В то же время у растений, которые находились в темноте при комнатной температуре, до-

стоверных изменений этих показателей не наблюдалось (данные не приведены). Таким образом, существенным фактором, влияющим на флуоресцентные показатели, являлся холодовой стресс. После охлаждения растений методом однофакторного дисперсионного анализа установлены достоверные различия между вариантами обработки и контролем (уровень доверия 95%) для всех использовавшихся показателей (табл. 2).

Согласно данным литературы, фотосинтез является одним из наиболее чувствительных к низким температурам физиологических процессов [16]. Известно также, что наиболее чувствительной к стрессовым воздействиям является ФС2, ответственная за флуоресценцию фотосинтезирующих объектов [17]. Таким образом, можно предположить, что пониженные флуоресцентные показатели листьев бархатцев после трехсуточного холодowego стресса в варианте контроля указывают на нарушения в структурно-функциональной организации фотосинтетического аппарата. В частности, снижается эффективность использования световой энергии в ФС2 (параметр Φ_{PSII}), нарушаются механизмы формирования протонного градиента на мембранах тилакоидов (параметр NPQ) и, как следствие, снижается фотосинтетическая активность (параметр $(F_M - F_T)/F_T$). Существенно, что обработка растений препаратами „Эпин-Экстра“ и „Силиплант“ повышала устойчивость фотосинтетического аппарата к низкой температуре, поскольку в этом случае

достоверных изменений флуоресцентных показателей после охлаждения не наблюдалось (табл. 2).

3. Заключение

Полученные в работе результаты позволяют сделать вывод, что флуоресцентные методы, основанные на регистрации индукционных изменений флуоресценции хлорофилла *in vivo*, могут быть использованы при разработке мероприятий, повышающих экологическую безопасность средств химизации, а также устойчивость растений к биогенным и абиогенным стрессам. Эти методы выгодно отличаются от более длительных и трудоемких биохимических исследований, применяемых при решении прикладных задач физиологии растений.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] G.H. Krause, E. Weis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.*, **42**, 313 (1991).
DOI:10.1146/annurev.pp.42.060191.001525
- [2] D. Lazar. *Biochim. Biophys. Acta*, **1412** (1), 1 (1999).
DOI: 10.1016/s0005-2728(99)00047-x
- [3] G.C. Papageorgiou, Govindjee (eds.). *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis* (Shringer, Dordrecht, 2004), 820 p. DOI: 10.1007/978-1-4020-3218-9
- [4] N.R. Baker. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **59**, 89 (2008).
DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759
- [5] V.A. Karavaev, I.B. Polyakova, M.K. Solntsev, T.P. Yurina. *J. Luminescence*, **76&77**, 335 (1998).
- [6] В.А. Караваев, М.А. Кукушкина. *Биофизика*, **43** (6), 1130 (1998).
- [7] С.А. Глазунова, В.В. Птушенко, Л.Э. Гунар, В.А. Караваев, М.К. Солнцев, А.Н. Тихонов. *Биофизика*, **54** (3), 495 (2009).
- [8] В.А. Караваев, Л.Э. Гунар, А.Г. Мякинков, М.С. Гинс, С.А. Глазунова, И.П. Левыкина, Ф.Д. Лепешкин. *Биофизика*, **57** (4), 662 (2012).
- [9] В.В. Птушенко, В.А. Караваев, М.К. Солнцев, А.Н. Тихонов. *Биофизика*, **58** (2), 313 (2013).
- [10] Л.Э. Гунар, А.Г. Мякинков, В.А. Караваев, И.Б. Полякова, М.К. Солнцев, Е.А. Кузнецова. *Лесной вестник*, **3** (34), 132 (2004).
- [11] Л.Э. Гунар, В.А. Караваев, Р.В. Сычев. *Известия ТСХА*, **2**, 78 (2008).
- [12] Б.А. Писарев. *Производство картофеля: возделывание, уборка, послеуборочная доработка, хранение* (Росагропромиздат, М., 1990), 223 с.
- [13] К.А. Пшеченков, В.Н. Зейрук, С.Н. Еланский, С.В. Мальцев. *Технологии хранения картофеля* (Картофелевод, М., 2007) 192 с.
- [14] S.-G. Kong, M. Wada. *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 522 (2014).
- [15] K. Maxwell, G.N. Johnson. *Exp. Botany*, **51**, 659 (2000).
DOI: 10.1093/jxb/51.345.659
- [16] В.Д. Креславский, Р. Карпентьер, В.В. Климов, Н. Мурата, С.И. Аллахвердиев. *Биологические мембраны*, **24** (3), 195 (2008).
- [17] C.D. Jiang, G.M. Jiang, X.Z. X. Wang, L.-H. Li, D.K. Biswas, Y.-G. Li. *Envir. Exp. Bot.*, **58** (1–3), 261 (2006).
DOI: 10.1016/j.envexpbot.2005.09.007