

УДК 635.918:581.132+581.5

Т. А. ЛАДЫЖЕНКО¹, Н. В. ГЕТКО¹, Л. Ф. КАБАШНИКОВА², Н. Л. ПШИБЫТКО²

**ПАРАМЕТРЫ ИНДУКЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА *a* ЛИСТЬЕВ
ТРОПИЧЕСКИХ И СУБТРОПИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ,
КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В ОРАНЖЕРЕЯХ**

¹Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, e-mail: tl-21@hotmail.com,

²Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, e-mail: kabashnikova@ibp.org.by

(Поступила в редакцию 18.04.2013)

Введение. Одним из общепринятых индикаторов состояния жизнедеятельности растений является эффективность первичных процессов фотосинтеза. Значение этого показателя определяется как важностью фотосинтетической функции в жизни растений, так и высокой чувствительностью фотосинтетического аппарата к изменениям факторов среды. Нарушения в первичных процессах фотосинтеза непосредственно отражаются на изменениях флуоресценции хлорофилла *a* и появляются задолго до видимых нарушений физиологического состояния растений. Флуоресценция хлорофилла является наиболее быстрым, удобным и информативным среди многих других экспериментальных методов, используемых для экологического мониторинга [1], для оценки физиологического состояния как отдельного растения, так и целых экосистем. Анализ флуоресценции хлорофилла используется при изучении тропических и субтропических видов растений в местах их естественного произрастания: *Catostemma sancarlosianum* Steuerm., *Heteropterys* sp., *Macairea rufescens* DC., *Pachira sordida* (RE Schult.) WS. Alverson, *Retiniphillum condor* (Spruce ex Benth.) Mull. Arg., *Remijia morilloi* Steuerm., *Monstera deliciosa* Liebm., *Euonymus kiautschovicus* Loes., *Stephania japonica* (Thunb.) Miers, *Vinca minor* L. [2].

Источником флуоресценции в растительной клетке являются светособирающие молекулы пигментов, преимущественно хлорофилла *a* ФС 2 [3]. Действие на растение стрессоров разной природы в подавляющем большинстве случаев сопряжено с влиянием на состояние реакционных центров (РЦ) ФС 2, антенны ФС 2 и светособирающего комплекса. Перенос энергии возбуждения электронов между пигментами именно этих комплексов и свечение хлорофилла *a* реакционных центров ФС 2 определяют индукционную кривую флуоресценции хлорофилла *a* [4].

После освещения предварительно адаптированных к темноте листьев растений в течение нескольких секунд первоначально наблюдается резкий подъем интенсивности флуоресценции хлорофилла – быстрая фаза, а затем в течение нескольких минут – переход через определенные стадии (медленная фаза) к стационарному уровню.

В работах [5, 6] показана высокая чувствительность параметров индукции флуоресценции хлорофилла *a* при оценке влияния повышенной температуры и обезвоживания на структурно-функциональное состояние фотосинтетических мембран проростков ярового ячменя разного возраста. Параметры РАМ-флуориметрии оказались весьма информативны при оценке физиологического состояния растений в условиях засухи [7].

Цель данной работы – изучение физиологического состояния тропических и субтропических растений, культивируемых в условиях оранжерей умеренного климата (оранжерейный комплекс ЦБС НАН Беларуси), на основе анализа параметров индукции флуоресценции хлорофилла *a*, характеризующих протекание в листьях фотохимических реакций, связанных с функционированием ФС 2.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования явились 13 видов растений тропической и субтропической флоры, культивируемых в оранжерейном комплексе Центрального ботанического сада НАН Беларуси, и в соответствии с их географической приуроченностью и экотопами, распределенных нами в пределах трех экологических групп (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Экотопы растений тропической и субтропической флоры

№ п/п	Вид (семейство)	Экотоп
1	<i>Brachychiton discolor</i> F. Muell. (<i>Sterculiaceae</i> Bartl.) <i>Nerium oleander</i> L. (<i>Apocynaceae</i> Juss.)	Сухие субтропики: леса, заросли по берегам ручьев, в сухих долинах, на морском побережье.
2	<i>Aucuba japonica</i> Thunb. cv. <i>variegata</i> (<i>Aucubaceae</i> J. Agardh) <i>Camellia japonica</i> L. (<i>Theaceae</i> D. Don) <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L. (<i>Malvaceae</i> Juss.) <i>Ochrosia elliptica</i> Labill. (<i>Apocynaceae</i> Juss.) <i>Pittosporum tobira</i> (Thunb.) Aiton cv. <i>variegata</i> (<i>Pittosporaceae</i> R. Br.) <i>Rhododendron indicum</i> (L.) Sweet (<i>Ericaceae</i> Juss.)	Влажные субтропики: леса, заросли вечнозеленых кустарников, морские побережья, территории позади мангровых зарослей, скалистые обнажения в ущельях, долины горных рек.
3	<i>Codiaeum variegatum</i> (L.) Blume f. <i>platyphyllum</i> cv. <i>hollufiana</i> (<i>Euphorbiaceae</i> Juss.) <i>Ficus benjamina</i> L. (<i>Moraceae</i> Link.) <i>Ficus triangularis</i> Warb. (<i>Moraceae</i> Link.) <i>Ficus binnendijkii</i> Miq. cv. <i>alii</i> (<i>Moraceae</i> Link.) <i>Coffea arabica</i> L. (<i>Rubiaceae</i> Juss.)	Влажные тропики: леса, подлесок тропических лесов, окраины влажных лесов, заболоченные леса, берега рек, равнины, подножия гор, морские побережья, горы.

Растения в оранжерее № 1 культивируются как горшечные культуры, а в оранжерее № 2 – частично как горшечные растения и частично – как грунтовые (*Brachychiton discolor*, *Ficus triangularis*, *Pittosporum tobira*, *Codiaeum variegatum*, *Hibiscus rosa-sinensis*, *Ficus binnendijkii*, *Coffea arabica*, *Ochrosia elliptica*, *Aucuba japonica*). Возраст растений от 3 до 10 лет.

Микроклимат оранжерей № 1 и 2 различен как в пределах самих оранжерей с субтропическим и тропическим режимами в каждой из них, так и между ними. Температура в целом ниже в оранжерее № 1, но при этом выделяется температурный максимум в летние месяцы. В оранжерее № 2 изменения температуры носят относительно более выравненный характер в течение года (минимум в осенний период). В режиме влажности нет значительных отличий между оранжереями, однако в оранжерее № 2 (субтропики) присутствует более сухой период в зимние месяцы.

Значимые различия наблюдаются в условиях освещенности. В солнечные дни в летние месяцы в оранжерее № 1 она достигает 50–60 тыс. лк, а в пасмурные – 10–15 тыс. лк, в зимний период соответственно – 1000 – 1500 лк и 500–800 лк. В условиях оранжереи № 2 освещенность в летний период в солнечные дни летом составляет 60–70 тыс. лк, а в пасмурные – 20–30 тыс. лк, в зимние месяцы соответственно – 5000–6000 лк и 2000–3000 лк. По климатическим показателям более близкой к естественным условиям обитания тропических и субтропических растений является оранжерея № 2.

Данные характеристики светового режима оранжерей ЦБС во многом зависят от таковых города Минска, где большую часть года преобладает пасмурное небо, и с октября по март количество пасмурных дней превышает 60 %, достигая 80–86 % в ноябре–январе. В течение теплого полугодия преобладают дни с переменной облачностью.

Долгота дня в тропической зоне на протяжении круглого года остается постоянной и примерно равной продолжительности ночи, т. е. 12 ч. В умеренной климатической зоне, в зависимости от сезона года, она составляет: в летнее время – от 14 до 16,5 ч, в зимнее – от 8 до 10,5 ч, в осеннее – от 13,5 до 8,5 ч, в весеннее – от 11 до 16 ч [8].

Параметры флуоресценции хлорофилла *a* определяли на флуориметре Teaching-PAM (Walz, Германия). Пробы растительного материала (листовые сегменты диаметром 10 мм) предварительно выдерживали в темноте в течение 15 мин. Включение модулированного с низкой частотой (32 Гц) измерительного света (650 нм) очень низкой интенсивности (0,04 мкмоль квантов/(м²·с) возбуждало минимальный уровень фоновой флуоресценции (F_0). Повышение выхода флуорес-

ценции до максимального уровня (F_m) инициировали включением света (665 нм) высокой интенсивности (3500 мкмоль квантов/(м²·с). Параметры фотохимической активности ФС 2 оценивали по величине отношения переменной флуоресценции к максимальной (F_v/F_m), характеризующей потенциальный квантовый выход фотохимических реакций ФС 2. Полученные данные обработаны при помощи Data Acquisition Software DA-TEACH. Все определения проводили в 3 повторностях. Стандартная ошибка измерения составляла не более 5–7 %.

Отбор проб листьев 1–2-го года развития осуществляли в период активного отрастания побегов у вечнозеленых тропических и субтропических растений (февраль–март) в условиях оранжерей ЦБС НАН Беларуси.

Результаты и их обсуждение. Анализ индукционного перехода флуоресценции хлорофилла *a* позволяет получить информацию о состоянии фотосинтетического аппарата, в частности об эффективности функционирования и состоянии ФС 2, которая в комплексе с ФС 1 ответственна за начальные стадии фотосинтеза [4, 9]. Наиболее часто используются следующие параметры индукции флуоресценции хлорофилла *a*:

F_0 – исходный уровень флуоресценции, который определяется флуоресценцией хлорофилла в условиях, когда все РЦ находятся в «открытом» рабочем состоянии и способны тушить флуоресценцию антенны, и составляет всего около 0,6 % от поглощенного света вследствие конкуренции с фотохимическими реакциями [10, 11]. Как правило, в нормальных условиях величина F_0 мала, что говорит об активном использовании клетками энергии поглощенного света. Но если при каких-либо воздействиях нарушается состояние фотосинтетических мембран, то РЦ переходят в неактивное (закрытое) состояние, поглощенная энергия света не может использоваться в первичных фотосинтетических реакциях и начальный уровень флуоресценции хлорофилла возрастает [12].

F_m – максимальный уровень флуоресценции наблюдается при «закрытых» РЦ ФС 2 и составляет около 3 % от поглощенного света [11].

F_v – переменная флуоресценции (разница между F_m и F_0). Она обусловлена той частью световой энергии, которая в первичных реакциях фотосинтеза утилизируется при открытых РЦ. Считается, что чем выше значение F_v , тем более благоприятными оказываются условия для функционирования фотосинтетического аппарата.

Величина отношения F_v/F_m – потенциальный квантовый выход фотохимических реакций ФС 2, коррелирует с максимальным квантовым выходом фотосинтеза, что позволяет использовать этот параметр для характеристики фотосинтетического процесса [10]. Этот показатель позволяет исследовать в живых объектах протекание фотохимических реакций, связанных с функционированием ФС 2 у высших растений – системы, наиболее чувствительной к факторам внешней среды.

В здоровых листьях, независимо от вида изучаемого растения, величина данного параметра близка к 0,8 [12], по [11] она составляет $0,832 \pm 0,004$, Д. Ю. Корнеев [13], ссылаясь на О. Vjörkman и В. Demmig, приводит значения 0,8–0,83. Меньшие величины отношения F_v/F_m указывают на то, что доля РЦ ФС 2 повреждена в результате явления, которое называется фотоингибированием и часто наблюдается у растений в условиях стресса [10, 11]. Параметр F_v/F_m в последнее время применяется в оценках устойчивости растений к неблагоприятным воздействиям различной природы. По мере усиления напряженности действия экстремального фактора наблюдается снижение величины параметра F_v/F_m , что отражает нарушения в функционировании электронтранспортной цепи (ЭТЦ) ФС 2 [4]. При этом F_v/F_m находится в диапазоне значений 0,6–0,8. Взаимосвязь между F_v/F_m и содержанием пигмент-белковых комплексов ФС 2 может быть нарушена, и дальнейшее увеличение содержания ФС 2 в образце не приводит к соответствующему повышению величины F_v/F_m . Кроме того, обнаружено, что величина F_v/F_m линейно коррелирует со скоростью выделения кислорода [13]. Таким образом, параметры индукции флуоресценции хлорофилла *a* являются весьма информативными и чувствительными показателями, характеризующими структурно-функциональное состояние фотосинтетических мембран растительных клеток.

Изучение параметров флуоресценции хлорофилла листьев тропических и субтропических растений (табл. 2) показало, что потенциальный квантовый выход фотохимических реакций

ФС 2 (F_v/F_m) у разных видов колеблется от минимального значения 0,66 (*Coffea arabica*) до максимального – 0,83 (*Hibiscus rosa-sinensis*). У других изученных нами таксонов этот показатель находится в диапазоне изменений 0,72–0,81. При этом значения, близкие к оптимальным (0,8), чаще встречались у растений, произрастающих в оранжерее № 2, т. е. в более благоприятных для них условиях культивирования, что в первую очередь связано со световым режимом – одним из главных факторов, влияющих на эффективность функционирования ФС 2.

Т а б л и ц а 2. Показатели флуоресценции хлорофилла *a* листьев тропических и субтропических растений

№ п/п	Вид	Оранжерея № 1				Оранжерея № 2			
		F_0	F_m	F_v	F_v/F_m	F_0	F_m	F_v	F_v/F_m
1	<i>Aucuba japonica</i>	0,16±0,01	0,58±0,02	0,42±0,02	0,73±0,01	0,13±0,01	0,49±0,01	0,36±0,02	0,73±0,02
2	<i>Brachychiton discolor</i>	0,16±0,01	0,63±0,03	0,47±0,03	0,74±0,01	0,14±0,01	0,58±0,03	0,44±0,02	0,76±0,01
3	<i>Camellia japonica</i>	0,12±0,01	0,55±0,06	0,43±0,06	0,77±0,03	0,13±0,01	0,45±0,03	0,32±0,03	0,70±0,01
4	<i>Codiaeum variegatum</i>	0,15±0,01	0,68±0,02	0,53±0,02	0,78±0,01	0,12±0,01	0,62±0,03	0,50±0,03	0,81±0,01
5	<i>Coffea arabica</i>	0,16±0,01	0,72±0,03	0,57±0,03	0,78±0,01	0,12±0,02	0,36±0,08	0,24±0,06	0,66±0,03
6	<i>Ficus benjamina</i>	0,13±0,01	0,63±0,01	0,51±0,02	0,80±0,02	0,12±0,02	0,58±0,03	0,46±0,01	0,80±0,02
7	<i>Ficus bennedijkii</i>	0,15±0,01	0,65±0,04	0,50±0,04	0,77±0,01	0,12±0,01	0,60±0,02	0,48±0,01	0,80±0,01
8	<i>Ficus triangularis</i>	0,14±0,01	0,64±0,03	0,50±0,03	0,78±0,01	0,12±0,01	0,60±0,02	0,48±0,01	0,81±0,01
9	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	0,14±0,01	0,63±0,01	0,49±0,01	0,78±0,01	0,10±0,01	0,59±0,01	0,49±0,01	0,83±0,01
10	<i>Nerium oleander</i>	0,14±0,01	0,62±0,01	0,48±0,01	0,77±0,01	0,10±0,01	0,41±0,02	0,31±0,02	0,76±0,01
11	<i>Ochrosia elliptica</i>	0,15±0,01	0,62±0,02	0,47±0,03	0,75±0,01	0,14±0,01	0,61±0,01	0,47±0,01	0,80±0,01
12	<i>Pittosporum tobira</i>	0,12±0,01	0,44±0,02	0,32±0,02	0,72±0,01	0,12±0,01	0,42±0,04	0,30±0,05	0,73±0,03
13	<i>Rhododendron indicum</i>	0,15±0,02	0,66±0,08	0,51±0,07	0,77±0,01	0,13±0,01	0,53±0,03	0,40±0,02	0,76±0,01

Показано, что мало различающиеся значения величин соотношения F_v/F_m в обеих оранжереях наблюдаются у таких видов, как *Brachychiton discolor*, *Pittosporum tobira*, *Rhododendron indicum*, *Ficus benjamina*, *Nerium oleander*, *Aucuba japonica*. Причем у *Pittosporum tobira* и *Aucuba japonica* этот показатель несколько ниже оптимального значения и составляет 0,72–0,73. Предположительно, в данном случае причиной снижения потенциального квантового выхода фотохимических реакций ФС 2 являются неблагоприятные условия выращивания, а именно недостаточно низкая температура, которая необходима для данных растений в зимний период, и притененное месторасположение в оранжереях. Сходную картину наблюдали и в случае с *Camellia japonica*, у которой в оранжерее № 2 низкое значение параметра F_v/F_m 0,70 предположительно вызвано теми же причинами.

У *Coffea arabica* наблюдаются значительные различия в показателях F_v/F_m : 0,78±0,01 в оранжерее № 1 и 0,66±0,03 в оранжерее № 2. Наиболее вероятным объяснением этому факту может служить исключительно высокая требовательность данного вида к интенсивности света, что невозможно осуществить в условиях оранжерей умеренного климата. Для окончательного вывода необходимы исследования и других параметров флуоресценции хлорофилла *a*.

Исходя из данных, представленных в табл. 2, можно сделать заключение, что такие тропические и субтропические виды, как *Codiaeum variegatum*, *Ficus triangularis*, *Ficus benjamina*, *Hibiscus rosa-sinensis*, *Nerium oleander*, *Rhododendron indicum*, у которых значения параметра F_v/F_m оптимальны, либо близки к ним в обеих оранжереях, обладают хорошо адаптированным и пластичным фотосинтетическим аппаратом.

Виды с оптимальными значениями F_v/F_m в оранжерее № 2 (*Ficus bennedijkii*, *Ochrosia elliptica*) требовательны к высокому уровню освещенности, высокой температуре и влажности воздуха в течение всего года.

Aucuba japonica, *Pittosporum tobira* и *Brachychiton discolor* характеризуются относительно низкими значениями показателя F_v/F_m в условиях обеих оранжерей, что указывает на недостаточно благоприятные условия для их произрастания и слабо адаптированный к ним фотосинтетический аппарат.

Показатели соотношения F_v/F_m у *Coffea arabica* и *Camellia japonica* оказались выше в оранжерее № 1 с выраженным недостатком света, хотя в естественных местах произрастания эти виды отличаются высокой требовательностью к инсоляции. В большей степени неблагоприятным в данном случае оказывается температурно-влажностный режим оранжереи № 2 с ее более высоким уровнем освещенности.

Заключение. Нами изучен характер изменений параметров индукции флуоресценции хлорофилла *a* у 13 видов тропических и субтропических растений, относящихся к 10 семействам, представляющих различные ареалы в сухих и влажных тропиках и субтропиках, культивируемых в условиях оранжерей Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Показано влияние микроклиматических условий оранжерей умеренного климата на функционирование ФС 2 и индукцию флуоресценции хлорофилла *a*, характеризующих степень адаптации фотосинтетического аппарата у разных групп тропических и субтропических растений к условиям культивирования. Данная методика может быть использована в мониторинге роста и развития тропических и субтропических растений в условиях оранжерей умеренного климата.

Литература

1. Волгушева А. А. // Математика. Компьютер. Образование. Сб. тр. XVI междунар. конф. / Под общ. ред. Г. Ю. Ризниченко. Ижевск, 2009. Т. 2. С.180–197.
2. Adams W. W., Zarter C. R., Mueh K. E. et al. // Advances in Photosynthesis and Respiration. 2006. Vol. 21. P. 49–64.
3. Полякова И. Б. Фотосинтез и его регуляция [Электронный ресурс] Электронный документ – Режим доступа: <http://bio.1september.ru/2002/33/6.htm>.
4. Нестеренко Т. В., Тихомиров А. А., Шихов В. Н. // Журн. общ. биол. Красноярск, 2007. Т. 68, № 6. С. 444–458.
5. Пишбытко Н. Л., Калитуха Л. Н., Кабашишникова Л. Ф., Волотовский И. Д. // Докл. НАН Беларуси. 2002. Т. 46, №6. С. 67–70.
6. Пишбытко Н. Л., Калитуха Л. Н., Кабашишникова Л. Ф. // Физиол. растен. 2003. Т.50, №1. С. 1–8.
7. Кабашишникова Л. Ф., Пишбытко Н. Л., Абрамчик Л. М. Методы оценки физиологического состояния растений в условиях засухи. Мн., 2007.
8. <http://avisdim.narod.ru/dictionary/dolgota-dnja.html>.
9. Maxwell K., Johnson G. N. // Journal of Experimental Botany. 2000. Vol. 51, № 345. P. 659–668.
10. Рубин А. Б. // Технология живых систем. 2005. Т. 2. С. 47–68.
11. Krause G. H., Weis E. // Annu. rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1991. Vol. 42. P.313–349.
12. Рубин А. Б. // Соросов. образов. журн. 2000. № 4. С. 7–13.
13. Корнеев Д. Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла. Киев, 2002.

T. A. LADYZHENKO, N. V. HETKO, L. F. KABASHNIKOVA, N. L. PSYBYTKO

PARAMETERS OF CHLOROPHYLL *a* FLUORESCENCE IN THE LEAVES OF TROPICAL AND SUBTROPICAL PLANTS, WHICH WERE CULTIVATED IN GREENHOUSES

Summary

The character of changes in the parameters of chlorophyll fluorescence induction of 13 species tropical and subtropical plants belonging to 10 families from different habitats in humid tropics and subtropics, cultivated in greenhouses of the Central Botanical Garden of Academy of Sciences of Belarus (CBG) was studied. The effect of micro-climatic conditions in CBG greenhouses on the functioning of PS 2 and the chlorophyll fluorescence parameters value was detected. Observed data characterized the degree of adaptation of leaf photosynthetic membranes in different ecological groups of tropical and subtropical plants to cultivating conditions.