

Е.Н. Заворуева, В.В. Заворуев

Флуоресцентный мониторинг фотосинтетического аппарата мелколиственных деревьев при антропогенном воздействии

Красноярская государственная архитектурно-строительная академия
Институт вычислительного моделирования СО РАН, г. Красноярск

Поступила в редакцию 16.09.2005 г.

Представлены результаты по исследованию концентрационной зависимости флуоресценции хлорофилла листьев березы. Установлено, что изменение параметра F_{682}/F_{734} в процессе вегетации описывается двумя параболой. Одна отображает период, когда происходит увеличение концентрации хлорофилла до максимального значения, другая – период старения листа. Минимум первой параболы наблюдается при концентрации хлорофилла в листьях во время цветения березы, а второй – перед началом окрашивания листьев. Определены более информативные параметры красной и дальней красной флуоресценции хлорофилла листьев березы для ранней диагностики их состояния в различных экологических условиях.

Благодаря высокой поглотительной активности растений происходит частичное очищение атмосферы и почвы от загрязнителей. Реакция растений на загрязнение может служить показателем состояния окружающей среды. В настоящее время ведутся интенсивные поиски экспресс-методов контроля физиологического состояния растений в различных условиях окружающей среды.

О негативном воздействии антропогенных факторов на жизнеспособность деревьев судят по их увяданию, когда происходят необратимые процессы, ведущие к полной гибели растений. Методы ранней диагностики отрицательного влияния загрязнения на фотосинтетические процессы только сейчас начинают разрабатываться. Чаще всего для этой цели применяют разнообразные варианты флуоресцентного анализа. Один из них заключается в том, что при комнатной температуре измеряют интенсивность в максимумах флуоресценции – в интервале 682–686 (F_{682}) и 730–742 нм (F_{734}) [1–3], а затем рассчитывают их отношение F_{682}/F_{734} . По этому параметру судят о степени воздействия факторов внешней среды на фотосинтетический аппарат растений [4, 5]. Диапазон изменения параметра F_{682}/F_{734} в процессе вегетации широколиственных деревьев рассмотрен в [6]. Существует другой параметр, который рассчитывается через максимальный и стационарный уровни флуоресценции. Он тоже характеризует воздействие факторов внешней среды на фотосинтетические процессы [7].

В связи с этим целью нашей работы состояла в изучении закономерности изменения названных выше параметров красной и дальней красной флуоресценции листьев березы на различные антропогенные воздействия.

Объектами исследования являлись листья березы повислой или бородавчатой (*Betula pendula*

Roth), собранные в мае–октябре. Деревья росли на территории Академгородка г. Красноярск (55°59' с.ш., 92°46' в.д.). В процессе вегетации деревья отбирали по три сформированных листа с шести деревьев в 12 ч дня местного времени.

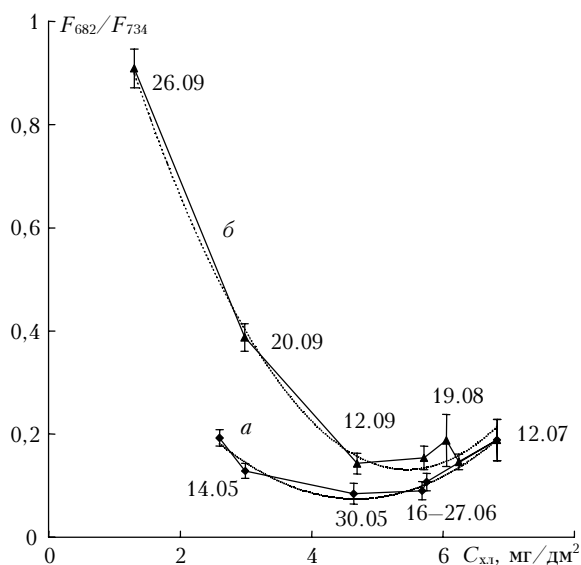
Измерения интенсивности флуоресценции хлорофилла листьев растений проводили на флуориметре, описание которого дано в [8]. Спектральную полосу 380–540 нм выделяли с помощью светофильтра СЗС-22. Интенсивность возбуждающего света составляла 180 Вт/м² ФАР. Эта освещенность близка к среднесуточной освещенности в летнее время года. Перед регистрацией флуоресценции выщипки листа выдерживали в темноте в чашке Петри с влажной фильтровальной бумагой в течение 40–60 мин. Свечение регистрировали при комнатной температуре.

По кривым медленной индукции флуоресценции хлорофилла определяли максимальное значение флуоресценции хлорофилла F_m и стационарное – F_s . Используя эти значения, рассчитывали индекс R_f , который фактически характеризует потенциальную фотосинтетическую активность листа [4]:

$$R_f = (F_m - F_s)/F_s.$$

Влияние тяжелых металлов в концентрации 10^{-3} М и диурона – 10^{-5} М проводили на срезанных ветках березы, древесная часть которых помещалась в колбы с соответствующими растворами. Для приготовления растворов использовали соли: NiCl_2 ; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; CdCl_2 и диурон (Sigma). Ветки выдерживали в течение 4 сут в естественных световых условиях.

Зависимость отношения красной и дальней красной флуоресценции F_{682}/F_{734} от концентрации хлорофиллов в листьях березы в процессе вегетации показана на рисунке.



Зависимость отношения F_{682}/F_{734} от концентрации хлорофиллов листьев березы в процессе вегетации (сплошная линия) и ее аппроксимация квадратичной функцией (пунктирная). Цифры у кривых указывают даты отбора проб

Изменение параметра F_{682}/F_{734} в процессе вегетации описывается двумя параболой. Первая парабола (а) характеризует период, когда происходит увеличение концентрации хлорофиллов до максимального значения:

$$y = 0,025x^2 - 0,232x + 0,616, \quad R^2 = 0,95,$$

а вторая (б) — период старения листа:

$$y = 0,045x^2 - 0,486x + 1,457, \quad R^2 = 0,99.$$

Минимум первой параболы наблюдается при концентрации хлорофилла в листьях во время цветения березы, а второй — перед началом окрашивания листьев. Максимальное значение F_{682}/F_{734} зарегистрировано перед опадом листьев. Отношение F_{682}/F_{734} в процессе вегетации для березы изменяется от 0,1 до 0,9, а для тополя, как было показано в [9], — от 0,1 до 0,3. Разный диапазон изменения отношения красной и дальней красной флуоресценции хлорофилла, вероятно, связан либо с тем, что в клетках широколиственных деревьев по сравнению с мелколиственными более высокие содержание и размеры хлоропластов, либо с видовыми особенностями исследованных видов высших растений [2].

Поскольку при выбранных условиях измерения интенсивность дальней красной флуоресценции хлорофилла листьев березы выше, чем красной флуоресценции, в дальнейшем мы использовали параметр F_{734}/F_{682} . Изменение этого отношения при воздействии антропогенных факторов на листья деревьев приведено в табл. 1. Следует отметить, что в таблице учтен вклад концентрационной зависимости параметра F_{734}/F_{682} , представленного на рисунке.

Как показали дальнейшие исследования, параметр F_{734}/F_{682} не всегда отражает воздействие антропогенных факторов на листья березы. Из

табл. 2 видно, что выращивание веток в растворах, содержащих соли тяжелых металлов, не приводит к достоверному изменению параметра F_{734}/F_{682} .

Таблица 1

Изменение отношения F_{734}/F_{682} в листьях березы

Дата	Здоровые листья	Листья, пораженные патогенными организмами	Листья из зоны антропогенного загрязнения атмосферы*
24.06.05	10,4±0,32	9,26±0,35	8,33±0,27
04.07.05	9,13±0,32	8,27±0,32	7,42±0,43
15.07.05	9,31±0,32	8,47±0,40	8,21±0,24

* ИЗА₅ > 14.

Таблица 2

Изменение флуоресцентных параметров и площади листьев при выращивании веток березы в растворах, содержащих соли тяжелых металлов

Действующий агент	F_{734}/F_{682}	R_{f682}	R_{f734}	S, % от контроля
Никель	9,17±0,46	0	0	49,2
Магний	9,98±0,67	3,45±0,19	2,48±0,32	100,0
Кобальт	8,35±0,34	1,47±0,31	1,54±0,20	50,9
Железо	8,15±0,50	2,44±0,44	1,73±0,26	77,4
Кадмий	9,20±0,45	0,86±0,27	0,71±0,35	34,5
Диурон	7,68±0,41	0,10±0,03	0,09±0,02	73,2
Контроль	9,01±0,49	2,80±0,38	2,32±0,22	100,0

Значимые различия наблюдаются только в присутствии диурона — ингибитора транспорта электронов между фотосистемами. Кстати, аналогичным образом воздействует большинство гербицидов.

Данные, приведенные в табл. 2, получены на листьях, которые находились в стадии формирования листовой поверхности. Все тестируемые растворы, кроме магния, угнетали ростовые процессы. Об этом свидетельствует площадь листьев S после четырех дней выращивания в присутствии солей тяжелых металлов. Аналогично закономерности изменения ростовых процессов изменялись индексы R_{f682} и R_{f734} . Коэффициент корреляции составлял 0,75 и 0,7 соответственно.

Действие тяжелых металлов и диурона на биосинтез хлорофиллов а и б в молодых листьях было следующее. В растворе кадмия содержание пигментов увеличилось на 44%, в присутствии диурона уменьшилось почти на 15%, а в остальных случаях падение концентрации не превышало 10%. При этом листья веток, находившихся в растворе никеля, почернели и засохли, в растворе кобальта — почернели около жилок, а в растворе кадмия засохли.

Далее исследовали действие тестируемых веществ на сформировавшиеся листья. Изменения параметра F_{734}/F_{682} практически были такими же, как и на молодых листьях (табл. 3). Никаких морфологических изменений в листьях березы не наблюдалось даже после 4 сут наблюдения. При этом концентрация хлорофилла практически не отличалась от контроля. Влияние тяжелых металлов сказалось на величине потенциальной фотосинтетической активности. Однако их действие на сформировавшиеся листья было иным, чем на молодые

листья. Например, магний вместо стимуляции фотосинтетической активности стал ее ингибировать, а кадмий перестал оказывать какое-либо воздействие.

Таблица 3

Изменение флуоресцентных параметров сформировавшихся листьев при выращивании веток березы в течение 4 сут в растворах, содержащих соли тяжелых металлов

Действующий агент	F_{734}/F_{682}	$R_f 682$	$R_f 734$
Никель	9,70±0,29	3,40±0,35	1,28±0,21
Магний	9,17±0,47	2,44±0,19	1,18±0,32
Кобальт	8,85±0,29	2,48±0,11	1,53±0,13
Железо	8,75±0,33	1,63±0,44	0,95±0,35
Кадмий	9,82±0,43	3,26±0,13	2,12±0,11
Диурон	7,88±0,10	0,06±0,03	0,00±0,00
Контроль	9,58±0,52	3,32±0,48	1,72±0,22

Морфологические изменения в сформированных листьях березы четко проявились на 12-й день выдерживания веток в растворах тестируемых веществ. Изменения концентрации хлорофилла в листьях и флуоресцентных параметров представлены в табл. 4, из которой видно, что содержание хлорофилла в листьях под действием солей тяжелых металлов уменьшилось.

Таблица 4

Изменение концентрации хлорофилла и флуоресцентных параметров сформировавшихся листьев при выращивании веток березы в течение 12 сут в растворах, содержащих соли тяжелых металлов

Действующий агент	Хл (a+b), мг/дм ²	F_{734}/F_{682}	$R_f 682$	$R_f 734$
Никель	6,08±0,42	5,51±0,13	0	0
Магний	6,56±0,38	8,46±0,17	0	0
Кобальт	3,87±0,27	6,99±0,09	0	0
Железо	2,35±0,18	7,14±0,14	2,49±1,10	1,94±0,59
Кадмий	1,98±0,15	2,78±0,13	0	0
Диурон	7,10±0,49	8,96±0,10	0	0
Контроль	7,49±0,52	8,16±0,28	3,20±0,84	2,03±0,32

Характерно, что величины R_f , зарегистрированные на 4-е сут (см. табл. 3), показывали отклонения от нормы для этих солей. Таким образом, потенциальная фотосинтетическая активность листа является параметром, который предсказывает изменения концентрации хлорофиллов раньше, чем они проявляются (4-й и 12-й дни соответственно). Сам же параметр R_f на 12-е сут наблюдения был равен нулю во всех растворах, кроме раствора железа. Хотя в последнем случае потенциальная фотосинтетическая активность была ниже, чем в контроле.

В сформированных листьях параметр F_{734}/F_{682} на 12-е сут наблюдения уменьшился в присутствии в растворе ионов никеля, кобальта, кадмия, железа и остался на одном уровне с контролем в присутствии магния и диурона.

Полученные данные свидетельствуют о том, что параметр F_{734}/F_{682} изменяется при поражении листьев болезнетворными организмами, при обработке несформировавшихся листьев березы гербицидами и при нахождении деревьев в загрязненной промышленными выбросами атмосфере. Однако он не изменяется в течение 4 сут выращивания деревьев в присутствии солей тяжелых металлов. Эти вещества вызывают морфологические изменения на 4-е сут в молодых листьях и на 12-е – в зрелых листьях березы. Ранним предвестником этих изменений являются индексы, которые отражают потенциальную фотосинтетическую активность на двух длинах волн – 682 и 734 нм.

1. *Кочубей С.М.* Спектральные свойства растений как основа методов дистанционной диагностики. Киев: Наук. думка, 1990. 136 с.
2. *Четвериков А.Г.* Принципы исследования реальных спектров флуоресценции фотосинтезирующих объектов // Биофизика. 1989. Т. 24. С. 82–90.
3. *Szabo K., Lichtenthaler H.K., Kcsanyi Z., Richter P.* A CCD-OMA Device for Measurement of Complete Chlorophyll Fluorescence Emission Spectra of Leaves During the Fluorescence Induction Kinetics // Radiat. and Environ. Biophys. 1992. V. 31. N 1. P. 153–160.
4. *Lichtenthaler H.K.* The role of Chlorophyll Fluorescence in the Detection Stress Condition in Plants // CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry. 1988. V. 19. P. 29–85.
5. *Lichtenthaler H.K., Burhart S.* Photosynthesis and High Light Stress // Bulgar J. Plant Physiol. 1999. V. 25. N 3. P. 3–16.
6. *Заворужева Е.Н., Заворужев В.В.* Изменение отношения пиков красной флуоресценции хлорофилла листьев *Populus balsamifera* в процессе вегетации // Докл. РАН. 2002. Т. 387. № 2. С. 258–260.
7. *Zavorujeva E.N.* Thermostability of plants in various light conditions of cultivation // Proc. SPIE. 2005. V. 5743. P. 652–658.
8. *Заворужев В.В., Заворужева Е.Н., Шелегов А.В.* Флуоресценция, возбуждаемая светом в диапазоне длин волн 380–540 нм, в листьях огурца в зависимости от времени вегетации и светового режима // Биофизика. 2000. Т. 45. Вып. 4. С. 704–711.
9. *Заворужева Е.Н.* Флуоресцентный мониторинг фотосинтетического аппарата широколиственных деревьев в процессе вегетации // Маг-лы Междунар. научно-практ. конф. «Лесопользование, экология и охрана лесов: фундаментальные и прикладные аспекты». Томск: STT, 2005. С. 166–168.

E.N. Zavorujeva, V.V. Zavoruev. Fluorescent monitoring of birch tree photosynthesis under anthropogenic impact.

The results of research of concentration dependence of birch leaf fluorescence are presented. It is established that a change of parameter F_{682}/F_{734} in the process of vegetation is described by two parabolas. One parabola describes the period of increase of chlorophyll concentration up to its maximum and the second one describes the period of leaf aging. The first parabola minimum is observed at chlorophyll concentrating in leaves during birch flowering, and the second – before colouring leaves. Most informative parameters of red and far red fluorescence of birch leaves are determined for early diagnostics of their state in different ecological conditions.