

ИЗУЧЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БЕРЕЗ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВЕРТИКАЛЬНОЙ ЗОНАЛЬНОСТИ

© 2015 Е.В. Пиняскина^{1,2}, А.Т. Маммаев¹, М.Х.-М. Магомедова¹

¹ Прикаспийский институт биологических ресурсов ДНЦ РАН, г. Махачкала

² Дагестанский государственный университет

Поступила в редакцию 25.05.2015

Изучали флуоресцентные параметры и количественные характеристики фотосинтетического пигментного комплекса листьев *Betula pendula* Roth. и *Betula litwinowii* Doluch, произрастающих на высотах -28 и 1800 м над уровнем моря. Показано, что с увеличением высоты произрастания уменьшается квантовые выходы флуоресценций (F и Fm) у берез Литвинова, растущих в парковой зоне города, относительно этих же видов, растущих на Гунибском плато. Выявлено увеличение содержания каротиноидов по высотному профилю и уменьшение общего содержания хлорофиллов, что связываем с их деструкцией в экстремальных природных условиях – разброс дневных и ночных температур, высокий уровень ультрафиолетового излучения, интенсивной инсоляцией в горах при широком разбросе дневных и ночных температур.

Ключевые слова: фотосинтез, флуоресценция, фотосинтетические пигменты, вертикальная поясность

Дагестан является уникальной моделью разнообразия эколого-географических и климатических условий. Находящаяся на стыке Европы и Азии, в восточной части Кавказа республика, на сравнительно небольшой территории, имеет разнообразнейший почвенный и растительный покров. Благодаря выраженной вертикальной зональности (от Прикаспийской низменности, находящейся на 28 метров н.у. Мирового океана, до снежных вершин высотой более 4 тысяч метров) и орографическому делению здесь представлены целые комплексы абиотических факторов. Поэтому Дагестан является великолепной экспериментальной площадкой для изучения действия как биотических, так и абиотических факторов на организмы, исследования адаптационных изменений, объясняющих механизм и природу адаптивности и устойчивости у растений к различным стресс-факторам.

Критерием приспособляемости древесных растений к условиям обитания являются ростовые и репродуктивные процессы, напрямую зависящие от эффективности первичных фотосинтетических процессов, весьма чувствительных к внешним воздействиям. Фотосинтетический аппарат (ФСА) претерпевает ряд трансформаций, которые обеспечивают текущие энергетические потребности

растений при изменении условий среды (Климов, 2008). Одной из наиболее информативных методик исследования трансформации ФСА является регистрация флуоресценции хлорофилла на этапе первичных процессов фотосинтеза, позволяющая оперативно получить данные о его функционировании [1]. Основная идея информативности фотолуминесцентных показателей состоит в том, что уменьшение эффективности запасаения света в фотосинтезе приводит к увеличению интенсивности флуоресценции. В свою очередь, деструкция или функциональное разобщение компонентов ЭТЦ, вызванное стрессовым воздействием внешних факторов, неизбежно отразится на интенсивности свечения. Это позволяет использовать фотолуминесцентные показатели в качестве оперативной оценки состояния эффективности фотосинтетического аппарата [1]. В литературе опубликованы данные о сезонных изменениях ФСА хвойных растений высокогорий. Однако, в литературе отсутствуют данные о сравнительных исследованиях активности ФСА у близкородственных видов растений по высотному градиенту.

Цель работы: продолжение исследований флуоресцентных показателей фотосинтетической активности листьев растений и их пигментного состава в зависимости от вертикальной зональности.

Материалы и методы исследований. Объектом исследования служили березы Повислая (*Betula pendula* Roth.) и Литвинова (*Betula litwinowii* Doluch.), произрастающих на территориях Гунибской экспериментальной базы Горного ботанического сада ДНЦ РАН на высоте 1800 м над уровнем моря и парковой городской зоне г. Махачкалы (28 м ниже уровня моря). Исследования проводились в

Пиняскина Елена Владимировна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экологической биофизики, доцент. E-mail: elpin1@rambler.ru

Маммаев Абдурахман Татаевич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией экологической биофизики. E-mail: eroha@yandex.ru

Магомедова Милана Хан-Магомедовна, научный сотрудник лаборатории экологической биофизики. E-mail: Milano-rom@mail.ru

вегетационные периоды 2014 г. Листовые пластинки березы собирали в мае-июне у деревьев примерно одного возраста.

Получение вытяжки пигментов. Навеску растительного материала 0,1 мг измельчали и тщательно растирали в ступке с небольшим количеством CaCO_3 , кварцевого песка в 100% ацетоне (2-3 мл), настаивали 2-3 мин для лучшей адсорбции. Полученный гомогенат отфильтровывали через стеклянный фильтр №3 в стеклянную пробирку (в колбе Бунзена, подсоединённой к водоструйному насосу). Экстракт доводили до 25 мл чистым растворителем. Содержание пигментов проводилось общепринятым спектрофотометрическим методом (СФ-46) с приготовлением ацетоновых вытяжек. Концентрации хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов в листьях определяли общепринятым методом абсорбционной спектрофотометрии (СФ-26) при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения определяемых пигментов в 100%-ном ацетоне: $\lambda=661,6, 644,8$ и 470 нм. Концентрацию пигментов в вытяжке рассчитывали по следующей формуле [2]:

$$\begin{aligned}Ca &= 11,24 \cdot D_{661,6} - 2,04 \cdot D_{644,8} \\Cb &= 20,13 \cdot D_{644,8} - 4,19 \cdot D_{661,6} \\Ca+b &= 7,05 \cdot D_{661,6} + 18,09 \cdot D_{644,8} \\Скар &= (1000 \cdot D_{470} - 1,9 \cdot Ca - 63,14 \cdot Cb) / 214\end{aligned}$$

где D_{470} , $D_{644,8}$, $D_{661,6}$ — оптическая плотность вытяжки при 470, 646,8 и 661,63 нм соответственно. Содержание пигментов (мг/г сырой массы листовых пластинок) рассчитывали по формулам:

$$\begin{aligned}Aa &= Ca \cdot V / 1000 \cdot P \text{ (мг/г)} \\Ab &= Cb \cdot V / 1000 \cdot P \text{ (мг/г)} \\Акар &= Скар \cdot V / 1000 \cdot P \text{ (мг/г)}\end{aligned}$$

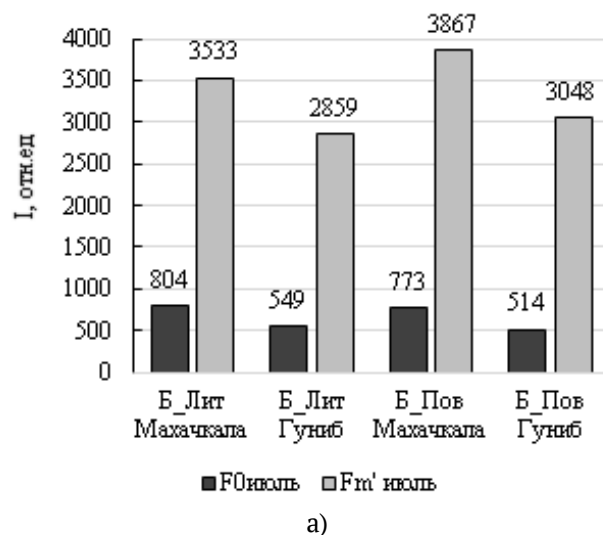
Количество повторностей от 7-10. **Параметры флуоресценции хлорофилла *a*** листьев измеряли с помощью флуориметра MINI-PAM (Pulse Amplitude Modulation) (Yeinz Walz, Германия).

В ходе экспериментов регистрировали следующие параметры флуоресценции: F_0 — интенсивность флуоресценции хлорофилла в адаптированных к темноте (15 мин) образцах при действии зондирующих импульсов возбуждающего света интенсивностью $0,15 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ФАР, длительностью 3 мкс и модуляционной частотой 600 Гц (галогеновый светодиод H-3000 Stanley, $\lambda=650$ нм); F_m — интенсивность флуоресценции хлорофилла во время действия 0,8 с насыщающей вспышки света, восстанавливающей первичные хинонные акцепторы QA до QA. Источник насыщающих световых импульсов и постоянного актиничного освещения — галогенная лампа 8 В/20 Вт (Bellaphot. Osram). Свет лампы проходит через двойной теплоотражающий фильтр (Balzers, DT Cyan, special). Y — максимальный квантовый выход фотосинтеза. Флуоресценцию регистрировали с помощью трехслойного полупроводникового фотодиода

(PIN-фотодиод) при длине волны более 700 нм, после прохождения через длинноволновый светофильтры (RG 9. Schott) и (Balzers DT Cyan, special, $\lambda_{\text{пропускания}}=650$ нм). Расстояние между образцом и оптоволоконным датчиком 12 мм. Измерения проводили на четвертом листе ветвей нижнего и среднего ярусов. Для измерений использовали не менее 10 побегов, срезанных с разных ветвей нижнего и среднего ярусов деревьев. Статистический анализ полученных данных проводили с использованием стандартного пакета Microsoft Excel 2013.

Результаты и их обсуждение. Во флуоресценции хлорофилла фотосинтезирующих объектов различают три основных компонента: фоновую флуоресценцию (F_0), не связанную с работой ЭТР, которая отражает состояние антенного хлорофилла, максимальную флуоресценцию F_m и варибельную ($F_v=F_m-F_0$), которая дает информацию о функционировании фотосинтетического аппарата.

Проведенные нами исследования флуоресцентных характеристик «городских» и «высотных» берез проводилось в июле и августе. Исследовали динамику изменения фотосинтетической активности растений в течение летних месяцев и исследовали флуоресцентные показатели берез в зависимости от вертикальной зональности. Полученные нами данные показали увеличение максимальной флуоресценции (F_m) у городских берез *B. pendula* относительно *B. litwinowii* в июле (почти в 1,09 раза) и августе при практически равной величине фоновой флуоресценции (F_0) (рис. 1). Та же тенденция прослеживалась и у Гунибских берез, что связано, видимо, с видовыми особенностями. При сравнении квантовых выходов флуоресценции (F_0 и F_m) по высотному градиенту, у городских берез *B. litwinowii* и *B. pendula* июльские показатели были почти в 1,25 раза выше относительно Гунибских, обратная корреляция наблюдалась в августе месяце (см. рис. 1). Видно, что зафиксированные нами флуоресцентные показатели в августе были ниже июльских (*a*) у все объектов.



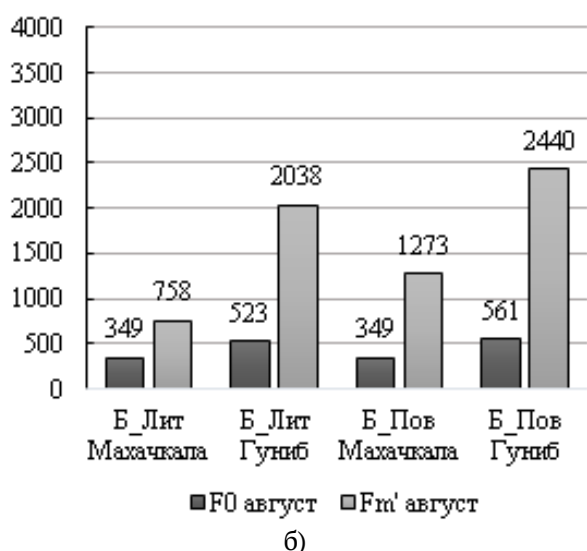


Рис. 1. Квантовый выход фоновой (F₀) и максимальной флуоресценции (F_m') городских и Гунибских берез *Betula pendula* Roth. и *Betula litwinowii* Doluch, а) – июль, б) – август)

Снижение уровня сигнала F₀ и F_m связывают с активацией реакций темновой фазы фотосинтеза (фотохимическое тушение) и увеличением тепловой диссипации в светособирающей антенне ФС2 (нефотохимическое тушение). Низкие значения F₀ и F_m у городских берез могут свидетельствовать и об усилении конкурирующего с флуоресценцией процесса – фотохимических реакций перераспределения зарядов между антенными комплексами и ФС II и могут рассматриваться как фотопротекторные реакции. Кроме того, по литературным данным величина F₀ может изменяться при воздействии неблагоприятных факторов – высокие температуры, избыточное освещение и др. [3-4], температура в городе в период исследований составляла +32- +36°C. Эффективность фотохимического превращения поглощенной световой энергии в ФС2 ($Y = F_v/F_m$) составляла у Гунибских образцов $0,81 \pm 0,02$ в июле (рис.2), что указывает на высокую потенциальную фотосинтетическую активность исследованных растений и приближается к теоретической [5].

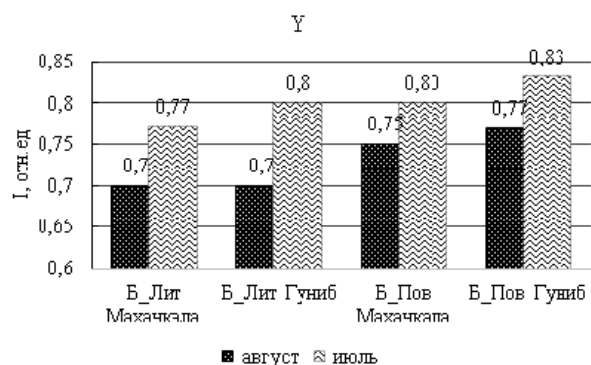


Рис. 2. Эффективность фотохимического превращения поглощенной световой энергии (Y) *Betula pendula* Roth. и *Betula litwinowii* Doluch

Изменение интенсивности фотосинтеза по высотному профилю обратно коррелирует с изменением суммарного содержания хлорофиллов *a* и *b* (см. рис. 3). Сравнение содержания фотосинтетических пигментов в листьях берез, собранных с опытных площадок выявило изменение соотношений в пигментном составе: уменьшение общего содержания хлорофиллов и увеличение каротиноидов (рис. 3). В высокогорье уменьшение содержания фотосинтетических пигментов приводит к ослаблению активности потенциального фотосинтеза, процессам фотовыцветания пигментов, ограничением их биосинтеза при низкой температуре и, в конечном итоге, к разрушению [6-7]. По нашим данным соотношение содержания хлорофилла *a/b* почти в 2 раза выше у городских берез, а увеличение содержания хлорофилла *a* – адаптационный показатель, индуцирующий усиление активности антиоксидантной системы хлоропластов при наличии негативного антропогенного влияния.

Содержание фотосинтетических пигментов является относительной величиной, которая рассчитывается в основном на единицу массы или площади листа. Данный показатель может зависеть не только от интенсивности освещения, но и от процессов, происходящих в самом растении: накопление или потребление запасных веществ, интенсивный рост, репродукция и т.д., которые могут изменять соотношение площади и массы. Одним из широко используемых характеристик фотосинтетического аппарата является показатель соотношения хлорофиллов и каротиноидов (Хл/Кар). В нашем случае это соотношение составляло *B.litwinowii* Doluch (Гуниб) – 7,9; *B.pendula* Roth (Гуниб) – 9,8; *B.litwinowii* Doluch (город) – 15,3, и *B.pendula* Roth (город) – 19,0. На рис. 3 видно, что % содержания каротиноидов у горных берез почти в 2 раза выше, чем у городских, поскольку выполняют протекторную функцию: на большой высоте интенсивный фон УФ-радиации, и высокая инсоляция индуцирует образование активных форм кислорода, что негативно влияет на функциональную активность хлоропластов. Кроме того, каротиноиды могут выступать в роли дополнительных светособирающих пигментов и защищать хлорофиллы и белки ФС и реакционных центров (РЦ) от фотодеструкции. Также имеются изоформы каротиноидов не принимающие участие в процессах передачи энергии квантов света для фотосинтетических реакций, которые могут выполнять стабилизирующую функцию, входя в состав фотосинтетических мембран, или являться предшественниками других соединений. В результате адаптации к инсоляции наблюдается уменьшение доли избыточного света за счет увеличения интенсивности электронного транспорта и тепловой диссипации.

Изменения интенсивности тепловой диссипации направлены на то, чтобы компенсировать лимитирование электронного транспорта путём безопасной утилизации той части энергии возбуждения,

которая не может быть использована для фотохимии. Однако низкая температура ограничивает фотохимическую утилизацию поглощенного света в связи с ингибированием фиксации CO_2 . В этих условиях тепловая диссипация является процессом, который вносит основной вклад в адаптацию фотосинтетического аппарата к условиям избыточного освещения. Адаптация к интенсивности освещения выражается в изменении площади фотосинтетических мембран, содержания и соотношения фотосинтетических пигментов, размера светособирающих комплексов (ССК), содержания экранирующих и абсорбирующих веществ. Полученные нами данные по снижению пластидных пигментов в расчете на единицу веса листа по вертикальной зональности согласуются с литературными данными [3, 8, 9].

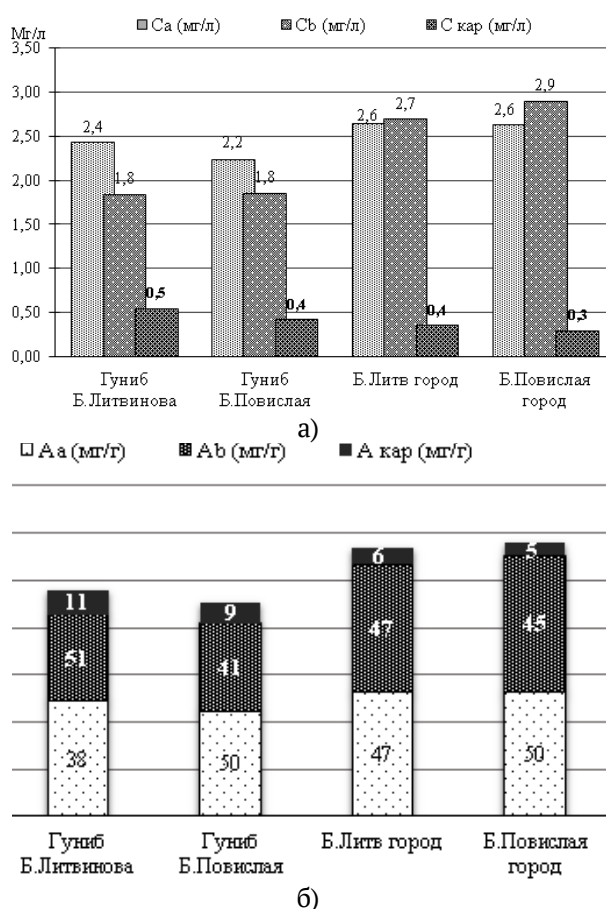


Рис. 3. Концентрация (а) и процентное содержание (б) фотосинтезирующих пигментов у берез с разных высот произрастания

Выводы: нами показано, что с увеличением высоты произрастания берез Повислой и Литвинова:

- квантовые выходы флуоресценции (F) и максимальной флуоресценции (Fm') «городских» берез выше, чем у Гунибских; зависят от продолжительности вегетационного периода

- снижение общего содержания хлорофиллов а и b связано с высокой инсоляцией, температурным ограничением биосинтеза, а также процессами фотовыцветания пигментов;

- увеличение содержания каротиноидов связано с защитной функцией

- увеличение соотношения хлорофилла a/b у городских берез.

Климатические условия, часто являясь ингибиторами и активаторами биоэнергетических процессов, протекающих в тилакоидах растительных клеток, способны оказывать выраженное влияние на эффективности первичных процессов фотосинтеза, нарушения которых отражаются в изменении флуоресценции хлорофилла а и появляются задолго до видимых изменений физиологического состояния растений. Изменение структурных, физиолого-биохимических и биофизических реакций исследуемых растений связано с высотным градиентом и является следствием действия совокупности абиотических факторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Lichtenthaler, H.K.* Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes // *Methods in enzymology*. 1987. V. 148. P. 350-382.
2. *Венедиктов, П.С.* Использование флуоресценции хлорофилла для контроля физиологического состояния зеленых насаждений в городских экосистемах / *П.С. Венедиктов, С.Л. Волгин, Ю.В. Казимирко и др.* // *Биофизика*. 1999. Т. 44, вып. 6. С. 1037-1047.
3. *James, J.C.* Growth and photosynthesis of *Pinus sylvestris* at its altitudinal limit in Scotland / *J.C. James, J. Grace, S.P. Hoad* // *Journal of Ecology*. 1994. V. 82. P. 297-306.
4. *Tausz, M.* Physiologische Methoden als Ergänzung zur Strepdiagnose an Fichten / *M. Tausz, M. Muller, E. Bermadinger-Stabentheier, D. Grill* // *Osterr Forstztg*. 1995. 106, № 11: S. 38-49.
5. *Петрушенко, В.В.* Адаптивные реакции растений: Физико-химический аспект. – Киев: Вища школа. Головное изд-во, 1981. 184 с.
6. *Слонов, Л.Х.* Адаптация экологических групп растений к разным условиям среды обитания. – Нальчик: Эльбрус, 1997. С. 35-78.
7. *Межуц, Б.Х.* Количественная характеристика фотосинтетических пигментов травяных растений горных экосистем Армении / *Б.Х. Межуц, М.А. Навасардян* // *Вестник тюменского государственного университета*. 2002. №12. С. 220-226.
8. *Попова, И.А.* Особенности пигментного аппарата растений различных ботанико-географических зон / *И.А. Попова, Т.Г. Маслова, О.Ф. Попова* // *Эколого-физиологические исследования фотосинтеза и дыхания растений*. – Л.: Наука, 1989. С. 115-140.
9. *Захидов, Э.А.* Флуоресценция хлорофилла как средство диагностики оптимальных температур фотосинтеза растений / *Э.А.Захидов, М.А. Захидова, М.А. Касымджанов и др.* // *Доклады Академии наук России*. 2002. Т. 382, №4. С. 563-566.

STUDYING THE FLUORESCENT INDICATORS OF BIRCHES PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY DEPENDING ON VERTICAL ZONALITY

© 2015 E.V.Pinyaskina^{1,2}, A.T. Mammaev¹, M.X-M.Magomedova¹

¹Precaspian Institute of Biological Resources DSC RAS, Makhachkala

²Dagestan State University

Fluorescent and quantitative characteristics of a photosynthetic pigmentary complex of leaves of *Betula pendula* Roth. and *Betula litwinowii* Doluch, growing at the heights of - 28 and 1800 m asl investigated. Reduction of quantity of chlorophyll on a high-rise profile is revealed that, we connect with intensive insolation in mountains, their destruction in an extreme environment – differences of daytime and night time temperatures, high level of ultra-violet radiation. The increase in quantity of carotinoids on a high-rise gradient that with protection of the photosynthetic device against destruction on light in the course of photooxidation in the conditions of the raised doses of an ultraviolet and ozone is noted.

Key words: *photosynthesis, fluorescence, photosynthetic pigments, vertical zones*

Elena Pinyaskina, Candidate of Biology, Leading Research Fellow at the Laboratory of Ecological Biophysics, Associate Professor. E-mail: elpin1@rambler.ru

Abdurakhman Mammaev, Candidate of Biology, Chief of the Laboratory of Ecological Biophysics. E-mail: epoha@yandex.ru

Milana Magomedova, Research Fellow at the Laboratory of Ecological Biophysics. E-mail: Milano-rom@mail.ru