

УДК 633.511+581.14+577.342

СВЯЗЬ ПАРАМЕТРОВ ИНДУЦИРОВАННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СОЛЕУСТОЙЧИВОСТИ СОРТОВ ХЛОПЧАТНИКА ВИДА *GOSSYPIUM BARBADENSE* L.

И.Г. АХМЕДЖАНОВ, В.С. АГИШЕВ, К.Б. ДЖОЛДАСОВА

*Институт биоорганической химии Академии наук Республики Узбекистан
100125 Ташкент, ул. М. Улугбека, 83
e-mail: iskakhm@mail.ru*

Исследовано влияние засоления на показатели солеустойчивости, активность фитохромной системы и параметры индуцированной флуоресценции листьев у контрастных по солеустойчивости генотипов хлопчатника. При выращивании растений на засоленной почве (0,3—0,5 % NaCl) установлено, что у устойчивых генотипов такие показатели, как индекс солеустойчивости, всхожесть, выживаемость растений, продуктивность, были в 1,5—2 раза выше по сравнению с показателями чувствительных к засолению генотипов. Выявлены высокие положительные корреляции между изученными показателями солеустойчивости, активностью фитохрома и характеристиками индуцированной флуоресценции хлорофилла листьев исследованных сортов хлопчатника, что указывает на перспективность использования этого метода для диагностики солеустойчивости генотипов хлопчатника.

Ключевые слова: *Gossypium barbadense* L., хлопчатник, засоление, солеустойчивость, фитохром, индуцированная флуоресценция хлорофилла.

В решении проблемы эффективного использования средне- и слабозасоленных почв наряду с мелиоративными мероприятиями важная роль отводится возделыванию солевыносливых сортов сельскохозяйственных культур, к числу которых относится хлопчатник. Несмотря на обширный материал, накопленный по физиологии солеустойчивости, надежные экспресс-методы ранней диагностики устойчивости различных генотипов хлопчатника к засолению не разработаны. В этой связи в программах по созданию солетолерантных сортов сельскохозяйственных культур важная роль отведена разработке физиологических критериев отбора, позволяющих ускорить скрининг солеустойчивых генотипов на ранних этапах развития.

В результате изучения набора местных интродуцированных тонковолокнистых сортов в градиенте искусственного почвенного хлоридного засоления установлено достоверное угнетение ростовых процессов и продуктивности, наличие генотипических различий и взаимодействие генотип—фон [12]. Корреляционный анализ ряда параметров (снижение энергии прорастания, всхожести, выживаемости растений, темпов наступления основных фаз, урожая и его компонентов) с уровнем засоления (0,3—0,5 % NaCl) показал, что наиболее адекватно отражают уровень солетолерантности всхожесть, выживаемость в фазу 2—3 настоящих

листьев, продуктивность хлопка-сырца 1 растения. На основе этих испытаний в вегетационных сосудах и лизиметрах разработан метод оценки солеустойчивости в ювенильном периоде, выделены генотипы, достоверно различающиеся по уровню солетолерантности в течение всего онтогенеза.

Ранее была выявлена взаимосвязь между степенью угнетения ростовых процессов на начальных стадиях развития растений и активностью фитохрома при засолении среды [2]. Это подтверждено как прямым измерением фотоактивности фитохрома, так и облучением красным светом (КС) семян: красный свет, активируя фитохромную систему, повышает солеустойчивость хлопчатника на ювенильном этапе онтогенеза. В результате исследований различных сортов хлопчатника установлена положительная корреляция между физиологическими характеристиками его устойчивости к засолению и активностью фитохромной системы этиолированных проростков, что дает возможность использовать параметры активности фитохрома в качестве дополнительных критериев оценки солеустойчивости генотипов хлопчатника [14].

Для оценки физиологического состояния растений в изменяющихся условиях окружающей среды используются флуориметры различной конструкции [1, 10, 17, 21], принцип действия которых основан на регистрации активности фотосинтетического аппарата растений, так как хлорофилл, находящийся в фотосинтетических мембранах, служит своего рода природным датчиком состояния клеток водорослей и высших растений [6]. Таким образом, при исследовании действия на растения стресс-факторов можно эффективно использовать метод индукции флуоресценции хлорофилла для быстрого тестирования устойчивости растений к неблагоприятным воздействиям [3, 5, 7, 8, 15, 17, 19].

В связи с этим целью данной работы было исследование влияния засоления на характеристики индуцированной флуоресценции листьев у контрастных генотипов, солеустойчивость которых изучена в течение всего онтогенеза в многолетних исследованиях, и выявить взаимосвязь между основными физиологическими показателями солеустойчивости, активностью фитохромной системы и параметрами индукционных кривых флуоресценции хлорофилла у тонковолокнистых сортов хлопчатника.

Методика

Объектом исследования служили растения контрастных по солеустойчивости сортов хлопчатника Ашхабад-25, С-6037 (толерантные) и Сурхан-2, Карши-2 (чувствительные), которые выращивали в лизиметрах на почве с уровнем засоления 0,3–0,5 % NaCl. Индекс солеустойчивости определяли как отношение массы абсолютно сухого вещества трехдневных проростков, выращенных на 0,4 % хлоридном почвенном засолении, к массе проростков в контроле и выражали в процентах [12].

Исследование фитохромной системы проводили путем измерения спектров возбуждения низкотемпературной люминесценции (НТЛ) 3-суточных этиолированных проростков на люминесцентном спектрометре [4], состоящем из монохроматора возбуждения, источника света, фотоприемника и регистрирующего устройства. Свет из монохроматора фокусировался на образец, находящийся в сосуде Дьюара с жидким азотом. Люминесцентное свечение собиралось параболическим зеркалом с поверхности образца под углом 35° к возбуждающему лучу и направлялось на фотокатод фотоумножителя через комбинацию светофильтров КС-5

и ФС-6, обеспечивающих пропускание только люминесцентного свечения и полное поглощение рассеянного света возбуждения. Перед измерением спектров возбуждения НТЛ фитохрома этиолированных проростков образец облучали при комнатной температуре дальним красным светом (ДКС) или КС для перевода пигмента соответственно в неактивную P_K - или активную P_{DK} -форму. Образец в темноте охлаждали до 77 К, помещая в сосуд Дьюара с жидким азотом, и регистрировали спектр возбуждения люминесценции в области 560–700 нм [11]. Фотообратимость фитохрома (R) рассчитывали по зависимости

$$R = 1 - I_{КС} / I_{ДКС},$$

где $I_{КС}$, $I_{ДКС}$ — максимальные интенсивности в спектрах возбуждения после облучения соответственно КС и ДКС.

Коэффициент относительного содержания активного (P_{DK}) фитохрома (P) определяли по формуле:

$$P = 1 - I_{инт} / I_{ДКС},$$

где $I_{инт}$ — максимальная интенсивность в спектре возбуждения до облучения проростков КС или ДКС [2].

Индукцированную флуоресценцию хлорофилла (ИФХ) листьев хлопчатника измеряли с помощью портативного флуориметра [1], принцип действия которого аналогичен компьютерному прибору «Флоратест» Института кибернетики им. В.М. Глушкова НАН Украины [10]. Источником возбуждающего света служили светодиоды синего света, измерение кинетики ИФХ проводили в спектральном диапазоне длин волн 670–770 нм [6]. Для оценки состояния растений в условиях засоления использовали следующее соотношение характеристик $F_m - F_t / F_m$ — степень снижения интенсивности флуоресценции хлорофилла, характеризующая интегральную активность фотосинтетического аппарата (F_m — максимальное значение индукции флуоресценции, F_t — стационарное значение флуоресценции после световой адаптации листа растения). Измерение ИФХ проводили на стадии 3-4 настоящих листьев, которые отбирали со среднего яруса растений хлопчатника. Эксперименты проводили в шести повторностях.

Результаты и обсуждение

Результаты исследований показали значительную разницу всех изученных в экспериментах физиологических показателей контрастных по солеустойчивости генотипов тонковолокнистого хлопчатника в условиях засоления, которые у солеустойчивых генотипов были в 1,5–2 раза выше (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. Влияние засоления на продуктивность, ростовые и физиологические показатели сортов хлопчатника

Сорт хлопчатника	Всхожесть семян, %	Выживаемость, %	Продуктивность, г/растение	Индекс солеустойчивости
Ашхабад-25	57,0±6,4	71,0±7,2	59,0±7,0	93,1
С-6037	66,0±4,9	63,0±8,8	61,0±6,3	94,0
Сурхан-2	26,2±3,8	32,0±5,0	46,0±5,1	75,1
Карши-2	31,8±5,2	35,0±3,7	46,0±3,8	69,4

СВЯЗЬ ПАРАМЕТРОВ ИНДУЦИРОВАННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

ТАБЛИЦА 2. Интенсивность спектров возбуждения низкотемпературной люминесценции и параметров фотоактивности фитохрома этиолированных проростков контрастных по солечувствительности сортов хлопчатника

Сорт хлопчатника	Интенсивность спектра			Фотоактивность	
	$I_{\text{нт}}$	$I_{\text{дкс}}$	$I_{\text{кс}}$	P	R
Ашхабад-25	60±3	97±7	35±2	0,38±0,12	0,64±0,07
С-6037	67±5	120±9	45±1	0,44±0,04	0,63±0,03
Сурхан-2	45±5	58±5	25±3	0,28±0,03	0,57±0,03
Карши-2	45±6	57±3	29±3	0,21±0,01	0,49±0,05

В табл. 2 представлены результаты исследований характеристик фитохромной системы использованных в экспериментах сортов хлопчатника. Интенсивность НТЛ этиолированных проростков у солечувствительных сортов (Сурхан-2, Карши-2) понижена по сравнению с устойчивыми генотипами (Ашхабад-25, С-6037). Облучение проростков КС и ДКС не изменяло этой тенденции. Поскольку интенсивность НТЛ этиолированных проростков определяется концентрацией фотопигмента в растительной клетке, различия в интенсивности свечения обусловлены неодинаковым содержанием фитохрома в этиолированных тканях контрастных по солестойкости генотипах хлопчатника. При этом фотообратимость фитохрома R в проростках солечувствительных сортов Сурхан-2 и Карши-2 была понижена на 15–20 %, а коэффициент P, указывающий относительное содержание активной формы пигмента — в 1,5–2 раза соответственно.

Таким образом, прослеживается тенденция к более высокой фотоактивности фитохрома у устойчивых сортов по сравнению с солечувствительными. При этом значения показателей R и P контрастных по устойчивости сортов различны: более вариабельна активная форма пигмента (показатель P). Это согласуется с полученными ранее данными о том, что засоление среды сильнее отражается на значении коэффициента P, которое снижается практически до нуля, тогда как фотообратимость фитохрома R ингибируется лишь наполовину [2].

Кривая ИФХ является отражением целого ряда процессов, происходящих в фотосинтетическом аппарате, поэтому изучение ее кинетики может дать важную информацию о его функционировании [18]. В пользу этого свидетельствует большое количество опубликованных работ, посвященных изучению с помощью данного метода влияния на функционирование системы фотосинтеза различных факторов среды [6, 9, 17, 22], в том числе и засоления [5, 13, 15, 21]. В то же время остается открытым вопрос о том, какие параметры ИФХ в наибольшей степени изменяются в условиях засоления. Показано влияние солевого стресса на такие показатели, как F_v/F_m , F_0 , F_m и др. [16]. Однако имеются сообщения [20], что засоление не влияет на флуоресценцию хлорофилла. Несмотря на это, измерение флуоресценции хл *a* широко применяется для мониторинга и отбора различных видов и генотипов по их устойчивости или толерантности к стрессовым воздействиям [19].

Результаты исследований ИФХ листьев показали, что в условиях засоления параметр $F_m - F_t/F_m$ претерпевает изменения практически у всех испытанных сортов, но в разной степени (табл. 3). Наибольшие изменения (до 40 %) отмечены у чувствительных к засолению сортов, что,

ТАБЛИЦА 3. Влияние засоления на характеристики индуцированной флуоресценции хлорофилла листьев хлопчатника

Сорт хлопчатника	$(F_m - F_t)/F_m$	
	Контроль	NaCl
Ашхабад-25	0,66±0,05	0,56±0,03
С-6037	0,67±0,04	0,56±0,04
Сурхан-2	0,65±0,05	0,39±0,05
Карши-2	0,61±0,03	0,42±0,04

очевидно, связано с изменением функциональной активности фотосинтетического аппарата растений (ФСА). Уже на стадии образования семядольных листьев фиксируется резкое изменение отношения $F_m - F_t/F_m$, что свидетельствует о серьезных нарушениях работы всех участков электронтранспортной цепи ФС II листьев растений хлопчатника сортов Сурхан-2 и Карши-2.

В аналогичных условиях выращивания солетолерантные сорта (Ашхабад-25, С-6037) оказались значительно устойчивее: изменения характеристик индукционных кривых флуоресценции были менее существенными по сравнению с чувствительными генотипами, не превышая уровня 20 % от показателей контрольных вариантов.

Таким образом, прослеживается тенденция к более высокой стабильности показателя ИФХ, характеризующего функциональную активность ФСА устойчивых сортов по сравнению с чувствительными при их выращивании на засоленной почве. Поскольку определение параметра $F_m - F_t/F_m$ наиболее легко реализуется в автоматическом режиме флуориметра, он, вероятно, также может служить индексом уровня солеустойчивости растения. Это согласуется с мнением о том, что при воздействии стресс-факторов окружающей среды на растения среди наиболее серьезных изменений в работе ФСА следует выделить и минимальное значение отношения максимального уровня флуоресценции к стационарному, т.е. использование отношения F_m/F_t кривых ИФХ, по мнению авторов, является весьма перспективным подходом к проблеме биотестирования, позволяющим уловить неблагоприятные изменения в состоянии организма задолго до появления видимых симптомов поражения растений [3]. Аналогичный вывод сделан в работе [8], где в качестве количественных оценок устойчивости растений при продолжительных неблагоприятных воздействиях предложено использовать динамику параметров медленной фазы ИФХ — отношения интенсивности флуоресценции в пике Р к стационарному уровню флуоресценции — F_p/F_S , а также вариабельность параметров ИФХ в этот период. В работе [10] отмечены различия на участке от F_m до F_p , заключающиеся в том, что под воздействием стресса спад на этом участке происходил медленнее, чем в контрольных группах.

Корреляционный анализ комплекса характеристик солетолерантности и параметров ИФХ листьев хлопчатника этих же сортов показал наличие положительной связи между ними. Максимальные величины коэффициентов корреляции ($r = 0,95...0,99$) отмечены между индексом солеустойчивости, продуктивностью растений на засоленной почве, активностью фитохромной системы и показателем $F_m - F_t/F_m$ ИФХ листьев растений, что еще раз подтверждает адекватность этих параметров. Вы-

сокие положительные корреляции ($r = 0,92...0,94$) выявлены также между характеристиками всхожести семян, выживаемости растений на засоленной почве и параметром $F_m - F_t / F_m$.

Таким образом, по результатам проведенных исследований установлена положительная корреляция между физиологическими показателями солеустойчивости хлопчатника, характеристиками фитохромной системы и параметрами индукционных кривых флуоресценции хлорофилла листьев, а также показана перспективность использования метода ИФХ для диагностики солеустойчивости генотипов хлопчатника.

1. Ахмеджанов И.Г., Агишев В.С., Джолдасова К.Б., Ташмухамедов Б.А. Применение портативного флуориметра для исследования влияния водного дефицита на характеристики замедленной флуоресценции листьев хлопчатника // Докл. АН РУз. — 2013. — № 3. — С. 58—60.
2. Ахмеджанов И.Г., Плеханова Л.С., Чечулина М.В., Злобина Т.В. Регуляция устойчивости хлопчатника к засолению хлористым натрием при облучении семян красным светом // Докл. АН РУз. — 1993. — № 11. — С. 49—52.
3. Вайшла О.Б., Лапина Г.В., Москвитина Н.С. О возможности использования физиолого-биохимических показателей листьев осины (*Populus tremula* L.) в ранней биоиндикации состояния экосистем // Сибир. экол. журн. — 1999. — № 3. — С. 261—269.
4. Джолдасова К.Б., Ахмеджанов И.Г., Гуссаковский Е.Е. Определение фитохрома в проростках семян хлопчатника методом собственной люминесценции // Докл. АН УзССР. — 1990. — № 6. — С. 48—50.
5. Иванов А.А. Функциональные изменения фотосинтетического аппарата у растений пшеницы при водном стрессе на фоне NaCl // С.-х. биология. — 2010. — № 3. — С. 88—93.
6. Корнеев Д.Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла. — Киев: Альтерпрес, 2002. — 188 с.
7. Креславский В.Д. Регуляция стресс-устойчивости фотосинтетического аппарата индукторами различной природы: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Пушкино, 2010. — 40 с.
8. Нестеренко Т.В., Тихомиров А.А., Шихов В.Н. Индукция флуоресценции хлорофилла и оценка устойчивости растений к неблагоприятным воздействиям // Журн. общей биологии. — 2007. — 68, № 6. — С. 444—458.
9. Пикуленко М.М., Булычев А.А. Использование параметров флуоресценции и генерации электрических потенциалов в мембранах растительных клеток для оценки состояния биологических объектов // Бюл. Моск. об-ва испыт. природы. Отд. биол. — 2007. — 112, № 1. — С. 80—84.
10. Романов В.А., Галелюка И.Б., Сахарин Е.В. Портативный флуориметр и особенности его применения // Сенсорная электроника и микроскопические технологии. — 2010. — 1(7), № 1. — С. 146—152.
11. Синещиков В.А., Синещиков А.В. Метод комплексного флуоресцентно-абсорбционного исследования фитохрома в растительных тканях // Физиология растений. — 1987. — 34, вып. 4. — С. 832—836.
12. Томаков А.А. Солеустойчивость форм хлопчатника вида *Gossypium barbadense* L. в онтогенезе: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Ташкент, 1994. — 25 с.
13. Трухина Ю.О., Шайбе Р., Еприцев А.Т. Влияние солевого стресса на основные физиолого-биохимические параметры растений картофеля // Вестн. ВГУ. Сер. Химия, биология. — 2000. — С. 138—143.
14. Чечулина М.В. Фитохромзависимая регуляция устойчивости хлопчатника к засолению на ранних стадиях онтогенеза: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Ташкент, 1998. — 25 с.
15. Bacarin M.A., Deuner S., Paulino da Silva F.S. et al. Chlorophyll *a* fluorescence as indicative of the salt stress on *Brassica napus* L. // Braz. J. Plant Physiol. — 2011. — 23, N 4. — P. 245—253.
16. Eyidogan F., Tufan O.M. Effect of salinity on antioxidant responses of chickpea seedlings // Acta Physiol. Plant. — 2007. — 29. — P. 485—493.
17. Lazar D., Silva P., Nail J. Early detection of plant stress from changes in distributions of chlorophyll *a* fluorescence parameters measured with fluorescence imaging // J. Fluorescence. — 2006. — 16, N 2. — P. 173—176.
18. Lichtenthaler H.K. The Kautsky effect: 60 years of chlorophyll fluorescence induction kinetics // Photosynthetica. — 1992. — 27, N 1—2. — P. 45—55.

19. Percival G.C., Fraser G.A., Oxenham G. Foliar salt tolerance of acer genotypes using chlorophyll fluorescence // J. Arboricult. — 2003. — 29. — P. 61—65.
20. Redondo-Gomez S., Mateos-Naranjo E., Davy A.J. et al. Growth and photosynthetic responses to salinity of the salt-marsh shrub *Atriplex portulacoides* // Ann. Bot. — 2007. — 100. — P. 555—563.
21. Smillie R.M., Norr R. Salt tolerance in crop plants monitored by chlorophyll fluorescence in vivo // Plant Physiol. — 1982. — 70. — P. 1049—1054.
22. Zlatev Z.S., Yordanov I.T. Effects of soil drought on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in bean plants // Bulg. J. Plant Physiol. — 2004. — 30. — P. 3—18.

Получено 18.03.2014

ЗВ'ЯЗОК ПАРАМЕТРІВ ІНДУКОВАНОЇ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ ХЛОРОФІЛУ ТА
ФІЗІОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ СОЛЕСТІЙКОСТІ СОРТІВ БАВОВНИКУ ВИДУ
GOSSYPIUM BARBADENSE L.

I.G. Akhmedzhanov, V.S. Agishev, K.B. Joldasova

Інститут біоорганічної хімії Академії наук Республіки Узбекистан, Ташкент

Досліджували вплив засолення на показники солестійкості, активність фітохромної системи та параметри індукованої флуоресценції листків у контрастних за солестійкістю генотипів бавовнику. За вирощування рослин на засоленому ґрунті (0,3—0,5 % NaCl) встановлено, що у стійких генотипів такі показники, як індекс солестійкості, схожість виживаність рослин, продуктивність були в 1,5—2 рази вищими порівняно з показниками чутливих до засолення генотипів. Виявлено високі позитивні кореляції між вивченими показниками солестійкості, активністю фітохрому та характеристиками індукованої флуоресценції хлорофілу листків вивчених сортів бавовнику, що вказує на перспективність використання цього методу для діагностики солестійкості генотипів бавовнику.

THE RELATION OF THE PARAMETERS OF CHLOROPHYLL INDUCED
FLUORESCENCE AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SALT RESISTANCE
OF THE DIFFERENT COTTON VARIETIES SPECIES *GOSSYPIUM BARBADENSE* L.

I.G. Akhmedzhanov, V.S. Agishev, K.B. Joldasova

Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of Republic of Uzbekistan
83 M. Ulugbek St., Tashkent, 100125, Uzbekistan

Effect of salinity on the characteristics of salt resistance, phytochrome activity and parameters of chlorophyll induced fluorescence of leaves of different by salt resistance genotypes of cotton plants was investigated. Plants growing at the salinity soil (0.3—0.5 % NaCl) showed that indices of salt resistance, seeds sprouting, plants surviving, productivity of the salt tolerance genotypes were about 1.5—2 time higher in comparison with the same characteristics of the sensitive to salinity genotypes. It has been revealed high positive correlation between the investigated characteristics of salt resistance, phytochrome activity and the parameters of induction curves of cotton leaves chlorophyll fluorescence. The possibility of application of the method of chlorophyll induced fluorescence for diagnostics of the salt resistance of different genotypes of cotton has been shown.

Key words: *Gossypium barbadense* L., cotton, salinity, salt resistance, phytochrome, chlorophyll induced fluorescence.