

МЕТОД ОЦЕНКИ ГАЗОУСТОЙЧИВОСТИ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ

А. Н. Юшков^{1,2*}, Н. В. Борзых¹, Н. Н. Савельева¹,
А. С. Земисов¹, В. В. Чивилев¹, Р. Е. Богданов¹

УДК 634:631.95

¹ Селекционно-генетический центр ФГБНУ ФНЦ им. И. В. Мичурина,
Мичуринск Тамбовской обл., Россия; e-mail: cglm@rambler.ru

² ФГБОУ ВО Мичуринский государственный аграрный университет,
Мичуринск Тамбовской обл., Россия; e-mail: a89050489146@yandex.ru

(Поступила 7 марта 2023)

На основе оценки уровня ингибирования фотосинтетической активности листьев при воздействии токсичных газов в лабораторных условиях разработан метод оценки газоустойчивости древесных растений, с помощью которого можно выявить устойчивые к загрязнению окружающей среды растения для дальнейшего практического и селекционного использования. В качестве индикатора толерантности генотипа использован уровень эффективности квантового выхода фотосистемы II. Чувствительность индикатора достаточна для дифференцирования контрольного и экспериментального вариантов. Проведено ранжирование изучаемых объектов по степени газоустойчивости и даны рекомендации по практическому применению нового метода.

Ключевые слова: газоустойчивость, загрязнение воздуха, фотосистема II, флуоресценция хлорофилла, эффективный квантовый выход.

The article describes the application of a method developed to assess the gas resistance of woody plants. With its help, it is possible to identify plants resistant to environmental pollution for further practical and breeding use. The method is based on the assessment of the level of inhibition of photosynthetic activity of leaves when exposed to toxic gases in the laboratory. As an indicator of genotype tolerance, the level of the effective quantum yield of photosystem II was used. The sensitivity of the indicator was quite sufficient to differentiate the control and experimental variants. The objects under study were ranked according to the degree of gas resistance and recommendations were given for the practical application of the new method.

Keywords: gas resistance, air pollution, photosystem II, chlorophyll fluorescence, effective quantum yield.

Введение. Проблема влияния загрязненного атмосферного воздуха на растения приобретает в настоящее время особую актуальность. Это связано с усилением антропогенного давления на природную среду, основными источниками которого являются объекты промышленности, энергетики и транспорта. Важную роль в поддержании чистоты атмосферного воздуха играют зеленые насаждения — природные фильтры и детоксиканты [1—3]. При этом ключевым фактором выступает подбор газоустойчивого ассортимента растений, способных полноценно функционировать в экстремальных условиях городской или промышленной среды. Таким образом, задача отбора газоустойчивых генотипов для озеленения урбанизированных территорий имеет важное научное и практическое значение. Несмотря на значительные достижения в исследовании генетических, физиолого-биохимических и биофизических механизмов газоустойчивости, недостаточно раскрыты или носят дискуссионный характер многие аспекты, касающиеся потенциала выносливости растений, используемых в озеленении.

METHOD FOR ASSESSING THE GAS RESISTANCE OF WOODY PLANTS

А. Н. Юшков^{1,2*}, Н. В. Борзых¹, Н. Н. Савельева¹, А. С. Земисов¹, В. В. Чивилев¹, Р. Е. Богданов¹ (¹ Selection Genetic Center of I. V. Michurin Federal Research Center, Michurinsk, Tambov region, Russia; e-mail: cglm@rambler.ru; ² Michurinsk State Agrarian University, Michurinsk, Tambov region, Russia; e-mail: a89050489146@yandex.ru)

В исследованиях по физиологии растений относительно широко распространен метод [4], базирующийся на искусственной фумигации листьев сернистым газом или хлором в герметичных камерах с последующей глазомерной оценкой повреждений. На наш взгляд, его сложно использовать при низких концентрациях газов, приводящих не к гибели клеток, а к их угнетению, как это происходит в реальных условиях. Для оценки устойчивости видов растений к загрязнению воздуха часто также используется индекс толерантности к загрязнению воздуха (АРТ). Он рассчитывается на основе комплекса косвенных параметров, коррелирующих с устойчивостью к загрязнению воздуха, таких как содержание аскорбиновой кислоты, общее содержание хлорофилла, относительное содержание воды, кислотность экстракта листьев [2, 5]. Данная методика требует больших затрат времени из-за проведения ряда биохимических анализов и малопригодна для экспресс-диагностики растений.

Возможности оценки функционального состояния растений способствовала разработка системы визуализации флуоресценции хлорофилла [6—8]. Этот метод зарекомендовал себя как эффективный инструмент для отображения физиологических явлений, коррелирующих с устойчивостью к различным стрессорам [9—12]. Методика успешно использовалась и при оценке реакции растений на изменение состава воздуха. Так, в [13] установлено, что обогащение воздуха озоном значительно снижало в листьях растений гороха (*Pisum sativum* L.) фактический квантовый выход, уровень фотохимического тушения и повышало нефотохимическое тушение.

Цель настоящей работы — адаптация системы визуализации флуоресценции хлорофилла для использования в опытах по оценке газоустойчивости растений; разработка и апробация неразрушающей методики, основанной на определении степени угнетения индукции флуоресценции хлорофилла (ИФХ), позволяет существенно ускорить и упростить процесс. При этом для моделирования стрессоров можно использовать минимальные концентрации поллютантов, более соответствующих полевым условиям.

Эксперимент. Исследования проводились в 2018—2022 гг. на базе лаборатории физиологии стрессоустойчивости Селекционно-генетического центра им. И. В. Мичурина (г. Мичуринск Тамбовской обл., Россия). Биологические объекты: сорта яблони декоративной: Кармелита, Гранатовый браслет (*Malus domestica* Borkh), яблоня Недзвецкого (*Malus niedzwetzkyana* Dieck), колонновидный сорт яблони домашней Каскад (*Malus domestica* Borkh), обладающие различной чувствительностью к загрязнению воздуха. Сорт Богатырь (*Malus domestica* Borkh) использован в качестве контроля, так как обладает в указанной зоне достаточной экологической адаптацией. Большую популярность приобретают яблони декоративная и колонновидная [14]. Выбор объектов исследования обусловлен перспективами их применения в озеленении.

Флуоресцентные исследования проводили методом импульсной амплитудно-модулированной флуориметрии [15] с использованием хлорофиллфлуориметра IMAGING-PAM и прикладной программы Imaging Win [16]. После темновой адаптации образцы подвергались действию насыщающих вспышек в режиме “световой кривой”. Общее количество импульсов насыщения 12, длительность 720 мс (12 импульсов по 60 мс с интервалами 20 с, интенсивность 2700 мкмоль/м²с). Параметры измерительного света: 0.5 мкмоль/м²с, 450 нм, 1 Гц. Предварительно проводилось искусственное моделирование загрязнения воздуха диоксидом серы. Опытный образец листьев, находящийся черешками в емкости с дистиллированной водой, помещали в герметичную камеру объемом 0.23 м³ и выдерживали 10 мин в присутствии сернистого газа концентрацией 150 мг/м³. Выбор концентрации обусловлен необходимостью оперативно получить реакцию фотосинтетического аппарата растения и в то же время не нанести тканям летальных повреждений. Известно, что в атмосферном воздухе рабочей зоны предприятий концентрация двуокиси серы может достигать 10 мг/м³ [17]. Однако такой уровень содержания газа при моделировании загрязнения требует продолжительной экспозиции. В связи с этим выбрана концентрация, существенно превышающая указанную, что является ограничением в применении метода. Кроме того, для проведения исследований необходимы лабораторные условия и специальное оборудование. В качестве количественного показателя восприимчивости растений к токсическому воздействию использован уровень угнетения одного из параметров ИФХ листьев — эффективный квантовый выход фотосистемы II (У(II)). За степень газоустойчивости принимали евклидово расстояние между “световыми кривыми” У(II), построенными для контрольного и опытного (подвергнутого воздействию диоксида серы) образцов. Исследования проведены с использованием метода, запатентованного авторами в 2022 г. [18].

Результаты и их обсуждение. Проведенные исследования показали, что у всех изученных генотипов моделирование загрязнения воздуха достоверно снижало уровень $Y(\text{II})$. Различия между флуоресцентными отображениями контрольных и опытных образцов листьев наблюдались на основе визуализации этого показателя по условной цветовой шкале. Их степень варьировалась в зависимости от генотипа (рис. 1). Так, у более восприимчивого сорта Богатырь контрольные и опытные показатели различались существенно в отличие от устойчивого сорта Гранатовый браслет.

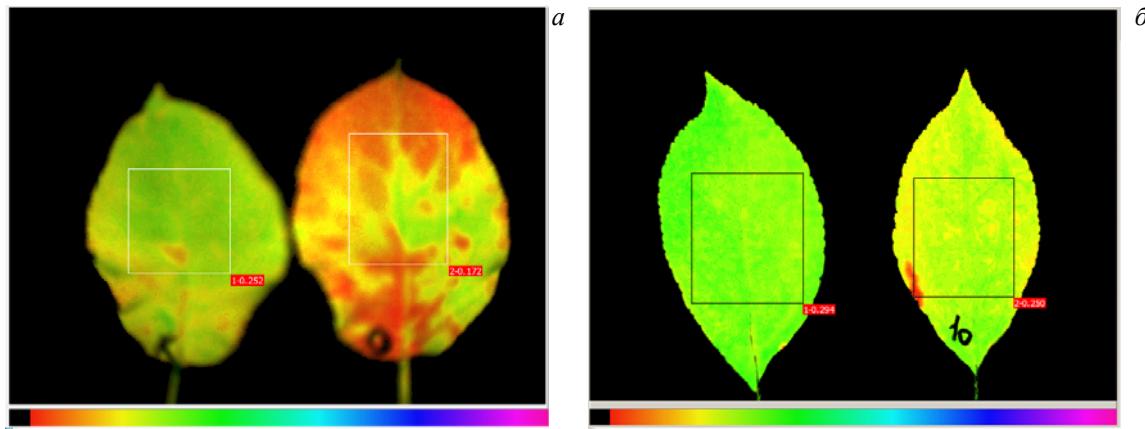


Рис. 1. Изображения листьев яблонь сортов Богатырь (а) и Гранатовый браслет (б) на основе визуализации показателя $Y(\text{II})$ по условной цветовой шкале РАМ-флуориметра

Параметры $Y(\text{II})$ при каждой вспышке во время проведения эксперимента представлены в виде так называемой “световой кривой”. Она характеризует степень изменения работы фотосинтетического аппарата под влиянием токсиканта. На рис. 2, а представлены “световые кривые”, характеризующие $Y(\text{II})$ для контрольного и опытного образцов листьев сорта Гранатовый браслет. Кривые расположены близко друг к другу, что свидетельствует о стабильности фотосинтетической активности листа на фоне токсического воздействия и, следовательно, более высокой газоустойчивости растения.

На рис. 2, б представлены “световые кривые”, характеризующие $Y(\text{II})$ для контрольного и опытного образцов листьев яблони сорта Богатырь. Кривые отдалены друг от друга, что свидетельствует о снижении фотосинтетической активности листа при токсическом воздействии и, следовательно, низкой газоустойчивости растения.

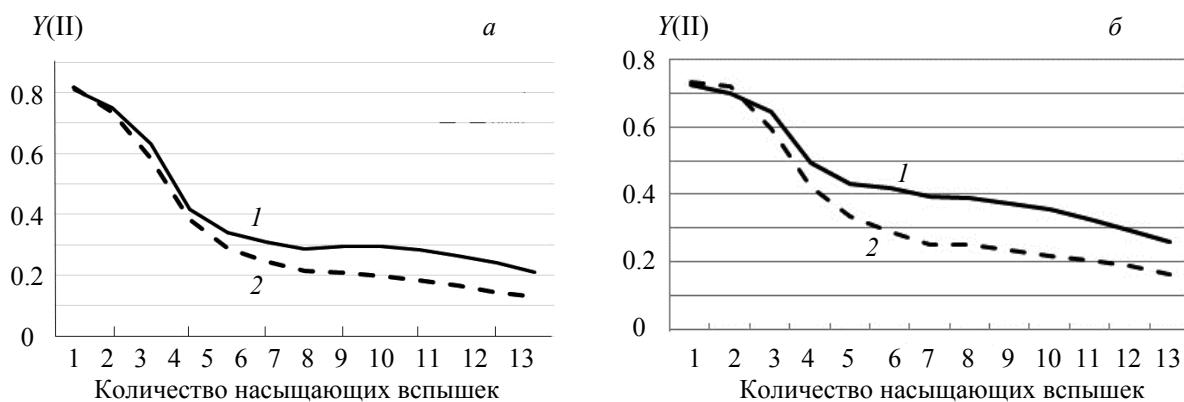


Рис. 2. “Световые кривые” влияния двуокиси серы на листья яблонь сортов Гранатовый браслет (а) и Богатырь (б): 1 — контроль, 2 — опыт

Для количественного выражения степени газоустойчивости объекта рассчитаны евклидовы расстояния между взятыми попарно значениями точек, формирующих “световые кривые” контрольного и опытного вариантов (табл. 1). Видно, что низким суммам евклидовых расстояний между контроль-

ным и опытным образцами соответствует высокая газоустойчивость соответствующего генотипа, так как влияние стрессора на фотосинтетическую активность листа в этом случае минимально.

Т а б л и ц а 1. Суммы евклидовых расстояний между “световыми” кривыми $Y(\Pi)$ контрольного и опытного образцов

Сорт	Сумма евклидовых расстояний
Гранатовый браслет	0.04
Каскад	0.07
Яблоня Недзвецкого	0.09
Кармелита	0.30
Богатырь	0.56

В. С. Nikolaevskiy [19] в исследованиях характеризует яблоню как среднеустойчивый вид среди древесных растений и кустарников. Однако разные виды яблонь существенно отличаются по уровню газоустойчивости. Одной из задач исследования было ранжирование сортов яблони по данному признаку с целью дать рекомендации по дальнейшему их использованию в декоративном садоводстве. Это стало возможным благодаря ускоренной оценке при неразрушающем методе, основанном на определении степени угнетения ИФХ. Для более детального изучения физиологических процессов устойчивости растений к токсическим веществам предложенный метод можно дополнить оценкой таких показателей, как реакция пигментного комплекса, pH клеточного сока, активность окислительных ферментов и водного режима [20].

Заключение. Визуализация индукции флуоресценции хлорофилла является чувствительным методом для дифференциации древесных растений по степени угнетения фотосинтетической активности на раннем этапе воздействия диоксида серы. При этом имеется возможность сравнивать одновременно несколько растительных объектов с учетом их пространственной неоднородности. Оценка динамики показателя эффективного квантового выхода фотосистемы II в режиме “световой кривой” позволяет четко различить контрольные и опытные образцы листьев ряда сортов при моделировании загрязнения атмосферы. Расчет евклидова расстояния между “световыми кривыми”, характеризующими эффективный квантовый выход фотосистемы II контроля и опыта, дает возможность количественно оценить уровень угнетения фотосинтетической активности и распределить генотипы по степени устойчивости. Максимальная устойчивость к загрязнению воздуха отмечена у колонновидных сортов яблонь Гранатовый браслет и Каскад. Эти сорта обладают уникальным компактным габитусом, универсальны в своем назначении и рекомендуются для селекционного использования, промышленных насаждений и зеленого градостроительства. Наибольшей восприимчивостью отличается сорт Богатырь, который рекомендуется высаживать в более экологически чистых районах, удаленных от промышленных зон.

- [1] S. K. Leghari, A. Akbar, S. Qasim, S. Ullah, M. Asrar, H. Rohail, I. Ali. Polish J. Environ. Studies, **28** (2019) 1759—1769, doi: 10.15244/pjoes/89587
- [2] V. É. Molnar, E. Simon, B. Tothmeresz, S. Ninsawat, S. Szabó. Air Pollution Induced Vegetation stress—The Air Pollution Tolerance Index as a Quick Tool for City Health Evaluation. Ecol. Indic (2020) 113, doi: 10.1016/j.ecolind.2020.106234
- [3] H. Yang, L. Jechan, H. Gu, K. Ki-Hyun, W. Peng, B. Neha, O. Jong-Min, R. J. Brown. J. Environ. Manag. (2021), doi: 10.1016/j.jenvman.2021.113860
- [4] Г. М. Илькун. Газоустойчивость растений, Киев, Наукова думка (1971) [G. M. Ilkun. Gas Resistance of Plants, Kyiv, Naukova dumka (1971)]
- [5] P. Zhang, L. Yan-ju, C. Xing, Y. Zheng, Z. Ming-hao, L. Yi-ping. Ecotoxic. Environ. Safety, **132** (2016) 212—223, doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.06.003
- [6] K. Oxborough. J. Exp. Botany, **55** (2004) 1195—1205, doi: 10.1093/jxb/erh145
- [7] E. Gorbe, A. Calatayud. Sci. Horticulturae, **138** (2012) 24—35, doi: 10.1016
- [8] J. M. Da Silva. In: Applied Photosynthesis – New Progress, Ed. M. Najafpour, Intech Open, London (2016), doi: 10.5772/62391
- [9] R. P. Barbagallo, K. Oxborough, K. E. Pallett, N. R. Baker. Plant Physiology, **132** (2003) 485—493
- [10] N. S. Woo, M. R. Badger, B. J. Pogson. Plant Methods, **27**, N 4 (2008) 1746—1811

- [11] **D. J. Chen, K. Neumann, S. Friedel, B. Kilian, M. Chen, T. Altmann C. Klukas.** Plant Cell., **26** (2014) 4636—4655, doi: 10.1105/tpc.114.129601
- [12] **J. Yao, D. Sun, H. Cen, H. Xu, H. Weng, F. Yuan, Y. He.** Plant Sci., **9** (2018) 603, doi: 10.3389/fpls.2018.00603
- [13] **I. M. Ismail, J. M. Basahi, I. A. Hassan.** Sci. Total Environ., **497-498** (2014) 585—593, doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.06.047
- [14] **Н. В. Борзых, А. С. Земисов, А. Н. Юшков, Н. Н. Савельева, В. В. Чивилев.** Садоводство и виноградарство, **2** (2023) 36—43
- [15] **U. Schreiber.** In: Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis, Eds. G. C. Papageorgiou, Govindjee, Springer, Dordrecht (2004) 279—319
- [16] IMAGING-PAM M-series Chlorophyll Fluorometer, IMAGING-PAM M-series Chlorophyll Fluorometer. Instrument Description and Information for Users 2.152 / 07.06 5. revised Edition (2014) 210
- [17] ГОСТ 12.1.005-88. Межгосударственный стандарт. “Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны” (утв. и введен в действие Постановлением Госстандарта СССР от 29.09.1988 N 3388, ред. от 20.06.2000)
- [18] **А. Н. Юшков, Н. В. Борзых, Н. Н. Савельева, А. С. Земисов, В. В. Чивилев, Р. Е. Богданов.** Способ оценки газоустойчивости древесных растений, патент 2766187C1, 09.02.2022, заявка № 2021103931 от 26.04.2021
- [19] **В. С. Николаевский.** Биологические основы газоустойчивости растений, Москва, Наука (1979) [V. S. Nikolaevskij. Biological Bases of Gas Resistance of Plants, Moscow, Nauka (1979)]
- [20] **В. Г. Еремеева, Е. С. Денисова.** Сибирский эколог. журн., **2** (2011) 263