

На правах рукописи
УДК 577.355

Францев Владимир Владимирович

**ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ АНТРОПОГЕННЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ
ФАКТОРОВ**

03.00.02 – биофизика
03.00.16 – экология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2006

Работа выполнена на кафедре общей физики физического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Научные руководители:

доктор физико-математических наук,
профессор Владимир Александрович Караваев

кандидат физико-математических наук,
доцент Михаил Константинович Солнцев

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук,
профессор Валерий Алексеевич Смирнов

кандидат физико-математических наук,
доцент Екатерина Александровна Кузнецова

Ведущая организация:

Институт фундаментальных проблем биологии
РАН (г.Пущино)

Защита диссертации состоится 21 декабря 2006 года в ___ часов на заседании диссертационного совета К 501.001.08 в МГУ им. М.В. Ломоносова по адресу: 119899, ГСП, г.Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова, физический факультет, аудитория ЮФА.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке физического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова

Автореферат разослан «___» _____ 2006 года

Ученый секретарь
диссертационного совета К 501.001.08
кандидат физико-математических наук

Г.Б. Хомутов

1. Общая характеристика работы

Постановка проблемы, ее актуальность

Фотосинтез – это процесс преобразования солнечной энергии в энергию химических связей. Если бы не было фотосинтеза, то жизнь на Земле в ее сегодняшнем многообразии была бы невозможна, от его эффективности напрямую зависит урожайность различных сельскохозяйственных культур. Особый интерес представляют первичные процессы фотосинтеза, в которых происходит поглощение квантов света, миграция энергии возбуждения на реакционный центр, первичное разделение зарядов, разложение молекул воды с выделением O_2 и перенос электронов по цепи электронного транспорта.

Освещая фотосинтетические объекты при пониженной температуре, а затем нагревая их в темноте, можно наблюдать явление термолюминесценции, связанное с рекомбинацией положительных и отрицательных зарядов, образовавшихся на донорной и акцепторной стороне второй фотосистемы. Изучение термолюминесценции предоставляет важную информацию о механизмах трансформации энергии света и эффективности ее запасаения в процессе фотосинтеза, позволяет контролировать протекание *in situ* тех физико-химических реакций, которые связаны с работой второй фотосистемы высших растений – комплекса, наиболее чувствительного к факторам внешней среды.

В последние годы предпринимаются попытки использовать термолюминесценцию в качестве одного из методов при решении целого ряда прикладных задач: исследовании влияния различных химических агентов на фотосинтетический аппарат, сравнительном анализе гербицидной активности, выяснении механизмов устойчивости растений к заболеваниям и т.д. Осложняющими обстоятельствами на этом пути являются, во-первых, отсутствие однозначной интерпретации кривых термолюминесценции и во-вторых, – значительная вариабельность биологических объектов. В этой связи необходимы систематические исследования термолюминесценции в комплексе с другими биофизическими методами, такими, как методы медленной индукции флуоресценции и электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), в том числе при обработке растений биологически активными веществами с широким спектром действия, как ингибирующими, так и активирующими фотосинтез. Результаты таких исследований важны для понимания природы термолюминесценции и могут быть использованы при проведении экологического мониторинга растительных объектов биофизическими методами. Особенно важным для экологических исследований может оказаться изучение природы полосы С, происхождение которой в последнее время изучается особенно активно. Одно из предположений о происхождении пика С заключается в том, что он связан с разрушением мембран, и по его величине можно оценивать влияние неблагоприятных факторов на растения.

Цель работы

Целью данной работы является изучение влияния антропогенных экологических факторов на фотосинтетический аппарат растений люминесцентными методами.

Задачи исследования

1. Исследовать действие на фотосинтетический аппарат веществ, повышающих устойчивость растений к заболеваниям, методами термолюминесценции и медленной индукции флуоресценции.
2. Изучить действие препарата BION[®] на термолюминесценцию листьев растений в области пика С в зависимости от концентраций препарата, способов и сроков обработки.
3. Методом медленной индукции флуоресценции провести исследование влияния крупных транспортных магистралей на функционирование фотосинтетического аппарата растений.
4. Исследовать действие солевого антифриза ХКМ (хлористый кальций модифицированный), используемого для борьбы с гололедом, на фотосинтетический аппарат растений методами термолюминесценции и медленной индукции флуоресценции.
5. Люминесцентными методами изучить совместное действие солевого антифриза ХКМ и природного полисахарида хитозана.

Научная новизна работы

Научная новизна работы заключается в систематическом изучении влияния на фотосинтетический аппарат препаратов, повышающих устойчивость растений к заболеваниям. Впервые изучено действие препарата BION[®] в зависимости от концентрации, сроков и способов обработки, а также водного экстракта из горца гигантского *Reynoutria sachalinensis* на люминесцентные показатели листьев растений. Такое исследование, проведенное с использованием ряда биофизических методов, позволило установить характер воздействия этих препаратов на фотосинтетический аппарат растений и дать рекомендации по их практическому применению.

В опытах с хитозаном и солевым антифризом ХКМ биофизическими методами впервые было показано, что при их совместном внесении в почву хитозан полностью нейтрализует негативное действие антифриза. При этом внесение одного только хитозана не вызывает негативного воздействия на растения. Эти данные, совместно с данными об увеличении хитозаном скорости фиторемедиации, позволяют дать рекомендацию по его использованию для улучшения состояния зеленых насаждений и почв в городах.

Для анализа полученных данных была разработана новая методика обработки кривых термолюминесценции, написана программа анализа данных по новой методике.

Практическое значение работы

Разработана новая методика обработки кривых термолюминесценции, позволяющая получать достоверную информацию об изменении термолюминесценции при обработке растений биологически активными веществами, используемыми на практике.

Изучение действия на растения хитозана позволяет предложить его использование для компенсации вредного воздействия антифризов и ускорения процесса фиторемедиации. Опыты с веществами, повышающими устойчивость растений к заболеваниям (препарат BION[®], экстракт из *Reynoutria sachalinensis*), позволили выявить их влияние на фотосинтетический аппарат и дать рекомендации по их практическому использованию.

Апробация работы

Основные результаты диссертации были доложены на III Всероссийской научной конференции «Физические проблемы экологии (экологическая физика)» (Москва, 2001), международной конференции «Актуальные вопросы экологической физиологии растений в XXI веке» (Сыктывкар, 2001), VI конференции Европейского общества фитопатологов (Прага, 2002), V международном симпозиуме «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования» (Пушино, 2003), III съезде биофизиков (Воронеж, 2004), международной конференции «Экология и биология почв» (Ростов-на-Дону, 2005), международных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов - 2005» и «Ломоносов - 2006» (Москва, 2005, 2006).

Основные результаты диссертации изложены в 13 публикациях, в том числе 5 статьях.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, 4 глав с изложением литературных данных и собственного экспериментального материала и выводов. Диссертация содержит 111 страниц, включая 41 рисунок и 16 таблиц. Список литературы включает 101 ссылку на работы отечественных и зарубежных авторов.

2. Содержание работы

Во **введении** обоснована актуальность темы, сформулированы цель и основные задачи работы, охарактеризована научная новизна полученных результатов.

Первая глава диссертации представляет собой обзор литературных данных.

В **разделе 1.1** дано описание структурно-функциональной организации фотосинтетического аппарата высших растений. В **разделе 1.2** изложены основы метода термолюминесценции, а в **разделе 1.3** описана структура комплекса второй фотосистемы. В **разделе 1.4** приведены современные представления о механизмах возникновения различных пиков термолюминесценции фотосинтезирующих объектов (таблица 1). **Раздел 1.5** посвящен описа-

нию математических моделей, описывающих термолюминесценцию растений. В разделе 1.6 приведены основные методы получения и обработки кривых термолюминесценции. Раздел 1.7 посвящен основам методов медленной индукции флуоресценции и спектров флуоресценции.

Таблица 1. Температуры максимумов и источники основных пиков термолюминесценции фотосинтезирующих объектов при температуре выше -30°C . Q_A , Q_B – первичный и вторичный хиноновый акцепторы электронов комплекса второй фотосистемы. S_2 , S_3 – состояния кислород-выделяющей системы при различной степени окисленности; TyrD – вспомогательный донор электронов комплекса второй фотосистемы.

Наименование пика	Пара зарядов	Температура максимума, $^{\circ}\text{C}$
A (Rubin, Venediktov, 1969, Inoue, 1996)	$S_3Q_A^-$	~ -10
A_T (Inoue et al., 1977, Inoue, 1996)	$\text{His}^+Q_A^-$	~ -10
D (Кукушкин, 1968; Rubin, Venediktov, 1969, Inoue, 1996)	$S_2Q_A^-$	$\sim +5$
B_1 (Arnold, Azzi, 1968; Ichikawa et al., 1975; Rubin, Venediktov, 1969, Inoue, 1996)	$S_3Q_B^-$	$\sim +25$
B_2 (Arnold, Azzi, 1968; Кукушкин, 1968; Ichikawa et al., 1975; Rubin, Venediktov, 1969, Inoue, 1996)	$S_2Q_B^-$	$\sim +35$
C (Arnold, Azzi, 1968; Rubin, Venediktov 1969)	$\text{TyrD}^+Q_A^-$ (Demeter et al., 1993), продукты деструкции мембран (Солнцев, 1989)	$\sim +50$
Высокотемпературная термолюминесценция	Хемилюминесценция	От $\sim +50$ до $\sim +70$ (Vavilin et al., 1998; Rózsa et al., 1989) $\sim +125$ (Vavilin et al., 1998)

Во второй главе дано описание объектов исследований и методик экспериментов. В работе использовали проростки пшеницы сорта «Любава» и бобов сорта «Русские Черные». Термолюминесценцию возбуждали непрерывным светом. Сначала высежку из листа растения подвергали предварительному освещению светом с длиной волны 720 нм в течение 1 минуты при комнатной температуре для окисления вторичных хиноновых акцепторов. Потом образец освещали белым светом при -30°C в течение 3 минут и реги-

стрировали свечение при нагреве от -80°C до 80°C со скоростью 30° в минуту.

В работе был применен новый метод для анализа кривых термолюминесценции. При обработке данных находили разность кривых термолюминесценции обработанных и контрольных растений. В той области температур, где разностная кривая отличалась от нуля, находили светосумму – $S_p(T_1, T_2)$. Полученные таким образом светосуммы подвергали статистической обработке. Для упрощения анализа кривых термолюминесценции была написана программа, позволяющая обрабатывать сразу несколько файлов.

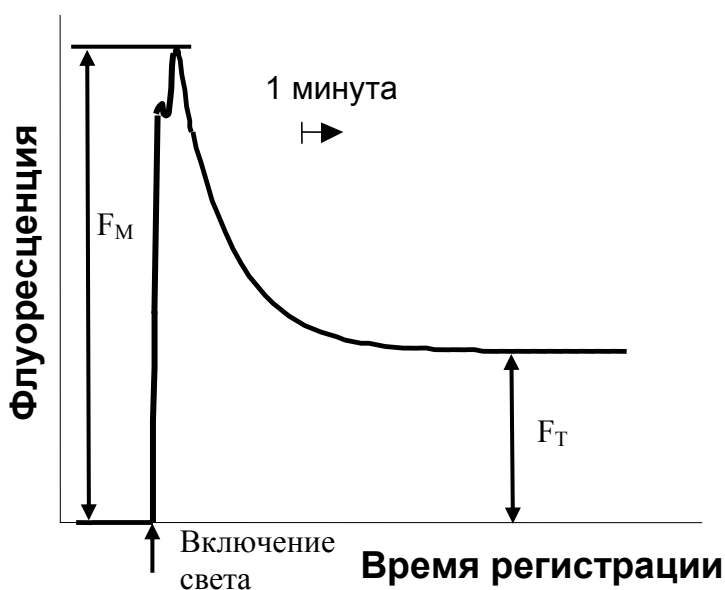


Рис. 1. Характерная кривая медленной индукции флуоресценции зеленого листа.

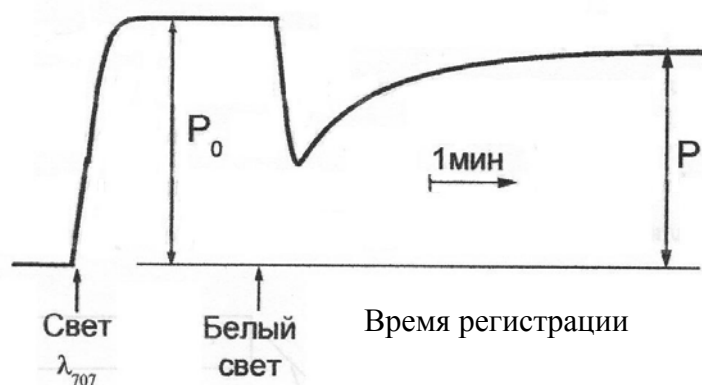


Рис. 2. Характерная кривая фотоиндуцированных изменений величины сигнала ЭПР I.

Медленную индукцию флуоресценции возбуждали широкополосным синим светом (50 Вт/м^2), а регистрировали на длине волны 686 нм . В качестве основного параметра использовали отношение $(F_M - F_T)/F_T = F_M / F_T - 1$ (или F_M/F_T), где F_M – интенсивность флуоресценции, соответствующая второму максимуму индукционной кривой (рис.1), F_T – ее стационарный уровень. Фотоиндуцированные изменения величины сигнала ЭПР I регистрировали на спектрометре E-4 (“Varian”, США) при освещении высечек из листьев дальним красным (707 нм) и белым светом. Характерная кривая фотоиндуцированных изменений величины сигнала ЭПР I, принадлежащего окисленным центрам P_{700}^+ , представлена на рис.2. В качестве параметра, характеризующего взаимодействие двух фотосистем, использовали отношение P/P_0 , где P и P_0 – стационарные значения сигнала ЭПР I соответственно на белом и дальнем красном свете.

Третья глава посвящена изучению биофизическими методами препаратов, повышающих устойчивость растений к заболеваниям.

В разделе 3.1 исследованы люминесцентные характеристики (термолюминесценция, медленная индукция флуоресценции и спектры флуоресценции) проростков пшеницы и бобов, обработанных препаратом BION® (действующее вещество – бензо [1,2,3] тиadiaзол – 7 – тиокарбоновой кислоты S – метил эфир) – активатором системной приобретенной устойчивости у растений.

Обработку проростков пшеницы производили спустя две недели после посадки и повторно – еще через неделю. Обработку производили опрыскиванием растений раствором препарата в дистиллированной воде в пропорции 20 мг препарата на 100 мл воды; контрольные растения опрыскивали дистиллированной водой. Измерения производили дважды: перед второй обработкой и через неделю после второй обработки.

В этих опытах было установлено, что препарат оказывает различное действие на проростки пшеницы с различным сроком хранения семян. На проростки пшеницы со сроком хранения семян 1 год препарат не оказал никакого влияния после первой обработки (рис.3). После второй обработки он вызвал появление пика С термолюминесценции и небольшое увеличение в области полосы А (рис.4).

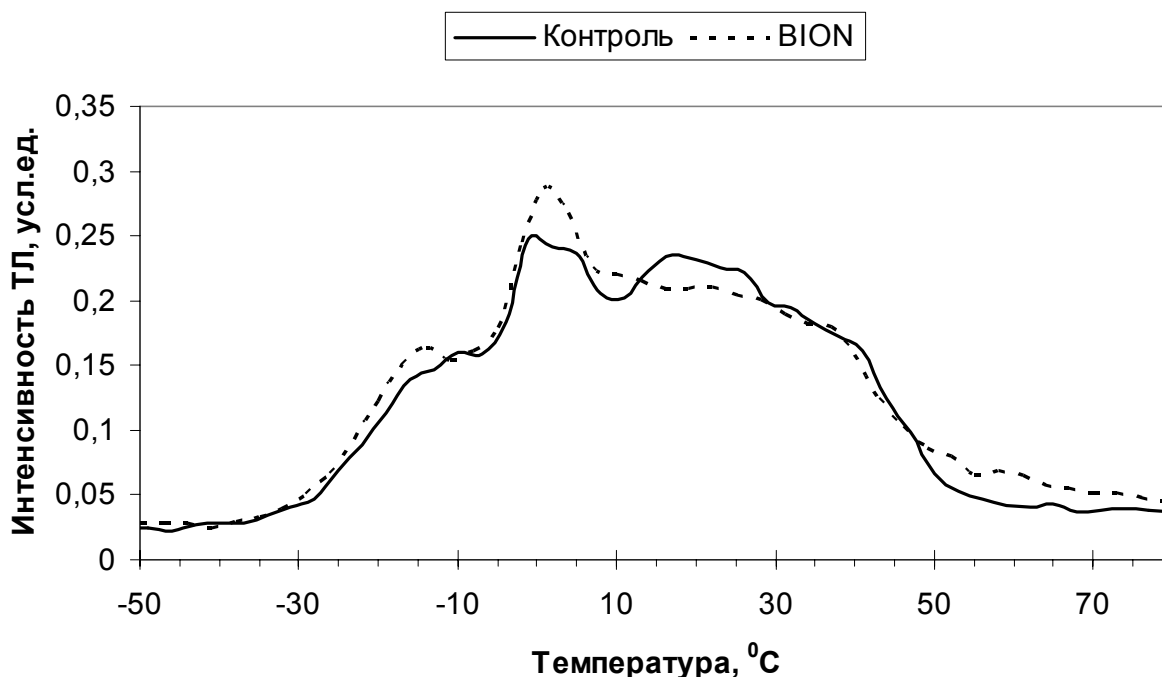


Рис. 3. Кривые термолюминесценции листьев пшеницы с 1 - летним сроком хранения семян после однократной обработки препаратом BION®.

В случае семян с 11 – летним сроком хранения полоса С появилась уже после первой обработки, а после второй обработки ее интенсивность увеличилась в 2 раза (рис. 5 и 6).

В опытах с пшеницей, выращенной из семян со сроком хранения 1 год, измеряли также медленную индукцию флуоресценции и спектры флуоресценции листьев растений. Однократное опрыскивание препаратом, как и в случае термолюминесценции, не привело к изменению параметра $(F_M - F_T)/F_T$

медленной индукции флуоресценции, тогда как повторное вызвало его увеличение. Увеличение параметра $(F_M - F_T)/F_T$ у обработанных растений свидетельствует о повышении их фотосинтетической активности в расчете на хлорофилл (Караваев и др., 1998).

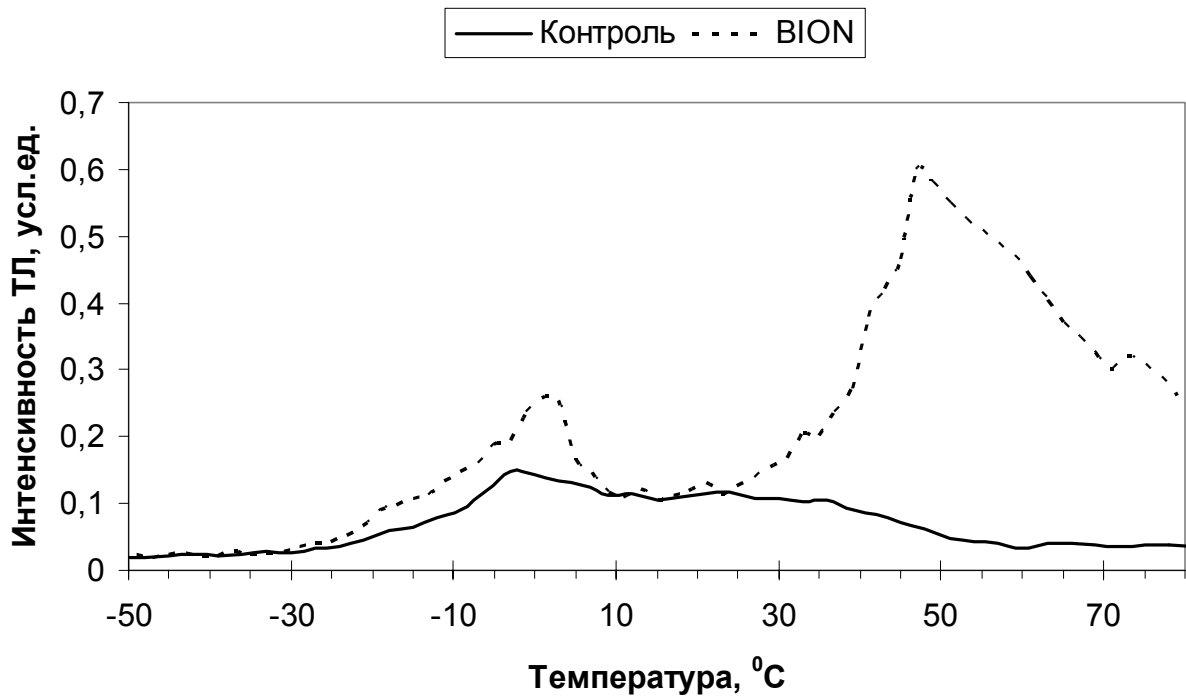


Рис. 4. Кривые термолюминесценции листьев пшеницы с 1 - летним сроком хранения семян после двукратной обработки препаратом BION®.

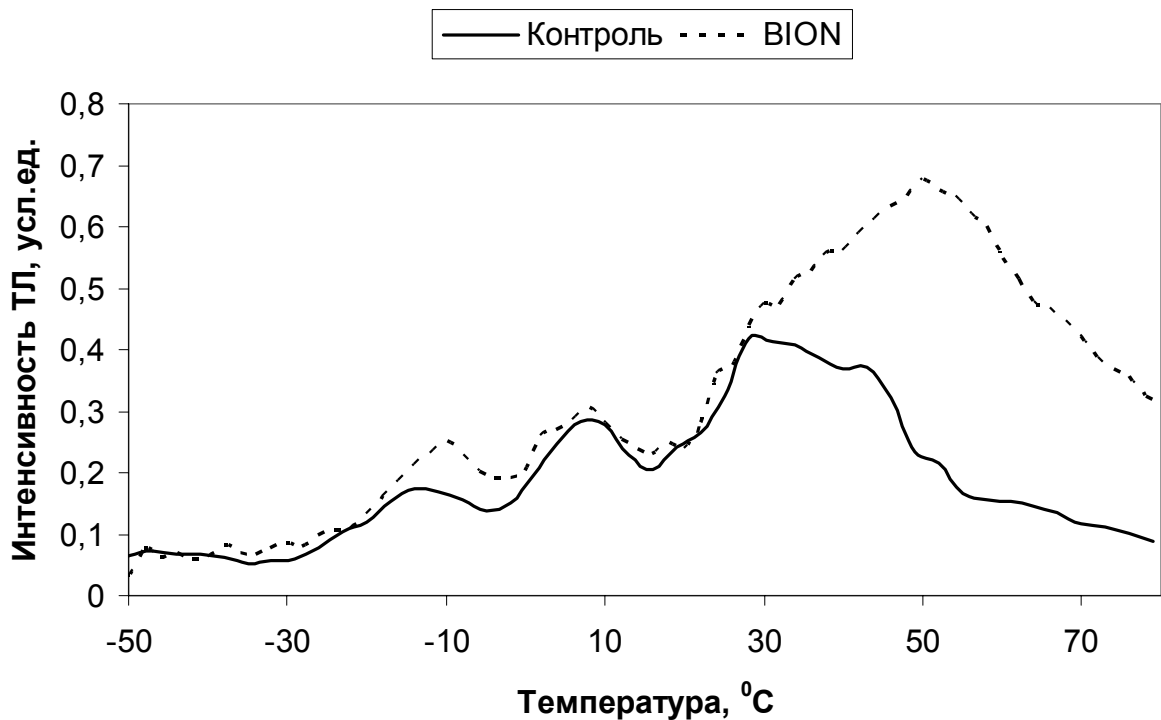


Рис. 5. Кривые термолюминесценции листьев пшеницы с 11 - летним сроком хранения семян после 1-ой обработки препаратом BION®.

В спектрах флуоресценции листьев растений при комнатной температуре были хорошо различимы два максимума при 680 нм и 730 нм. Предполагается, что максимум флуоресценции при 680 нм связан с фотосистемой 1, а при 730 нм – с фотосистемой 2 (Krause, Weis, 1991, Peterson et al., 2001). Проведенное нами исследование спектров флуоресценции показало, что ни первая, ни вторая обработка не вызвали изменений в соотношении максимумов флуоресценции. Таким образом, можно сделать вывод, что распределение энергии между первой и второй фотосистемами после обработки препаратом не изменилось.

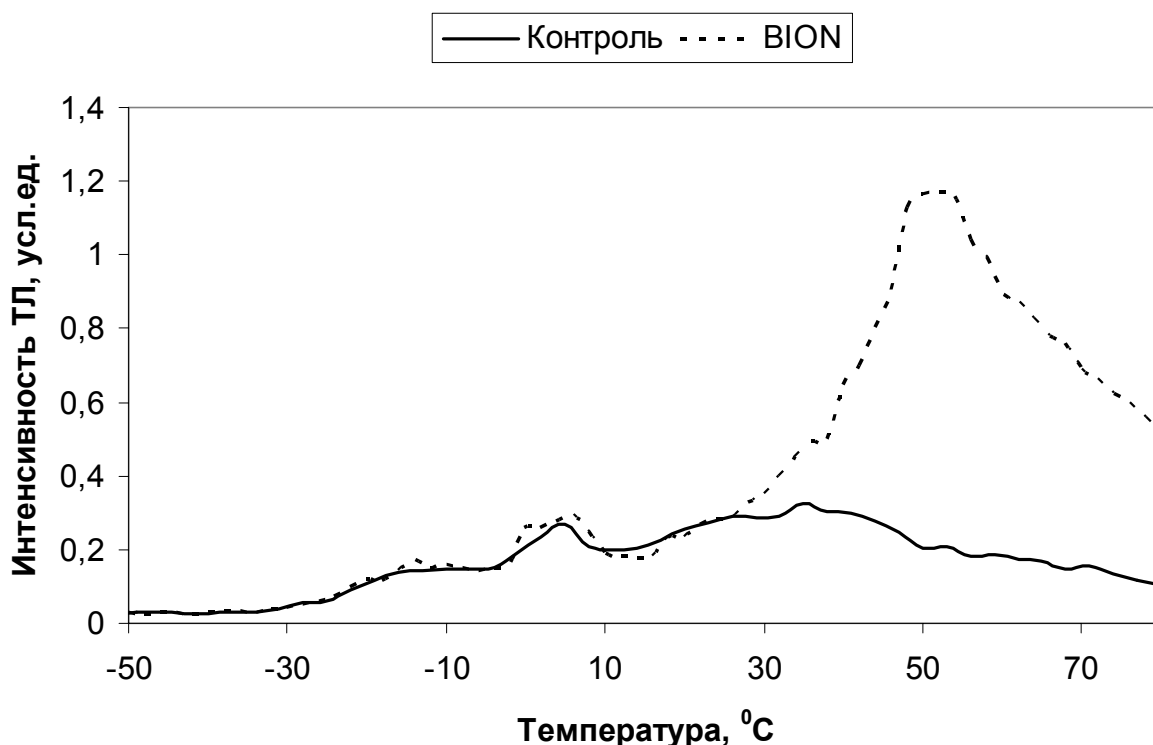


Рис. 6. Кривые термолюминесценции листьев пшеницы с 11 - летним сроком хранения семян после 2-ой обработки препаратом BION®.

Опыты с проростками пшеницы, выращенными в условиях гидропоники (измерения проводили спустя три недели после посадки), показали, что в случае проростков с 11 - летним сроком хранения семян величина пика С изменялась прямо пропорционально концентрации препарата (рис.7). Для проростков семян с 1 - летним сроком хранения также наблюдали появление пика С под действием препарата BION®, но величина пика при различных концентрациях была в пределах погрешности одинаковой (рис.8).

Оценка состояния проростков пшеницы по их внешнему виду показала, что с увеличением концентрации препарата (в области от 1 мг/30 мл до 4 мг/30 мл) состояние растений ухудшается.

В работах (Golovina, Tikhonov, 1994; Golovina et al., 1997) приведены данные, что длительное хранение семян вызывает нарушение в структуре цитоплазматических мембран. Можно предположить, что увеличение ТЛ в об-

ласти полосы С связано с разрушением мембран при замораживании, и источником пика С является реакция продуктов деструкции мембран с кислородом, протекающая при нагреве. Обработка проростков препаратом BION[®], как предполагается, приводит к усиленной наработке активных форм кислорода, которые, по-видимому, оказывают дополнительное негативное влияние на структурные характеристики мембран.

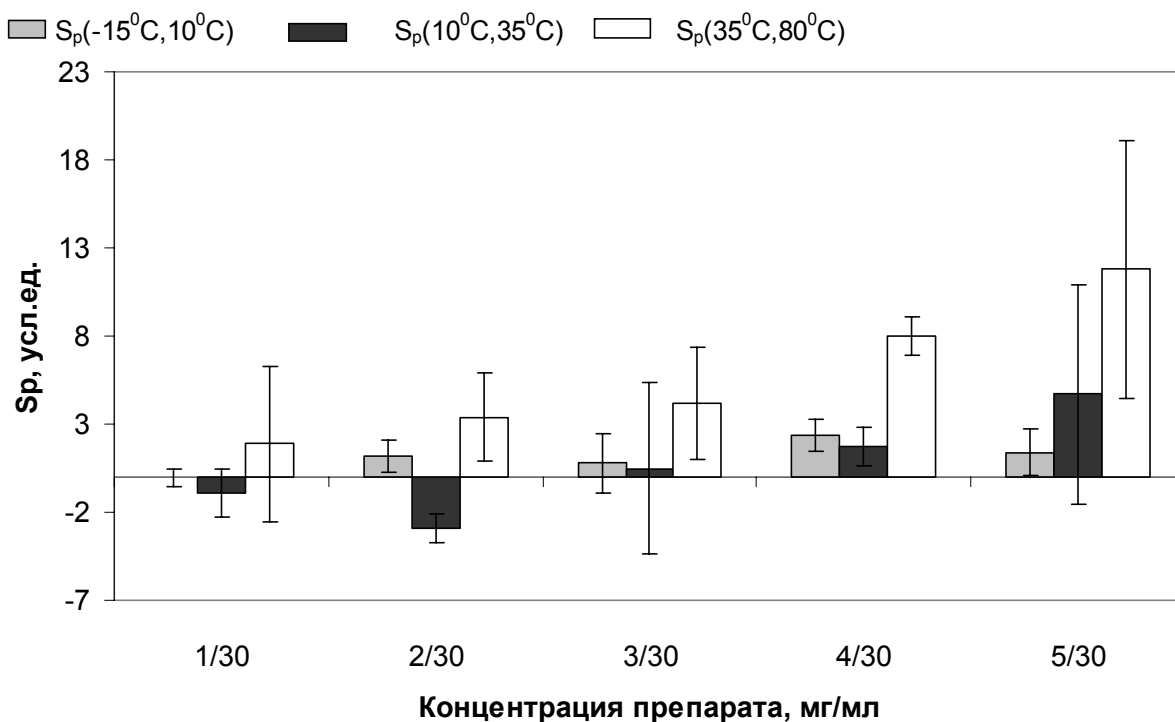


Рис. 7. Зависимость параметра $S_p(T_1, T_2)$ от концентрации препарата BION[®]. Пшеница «Любава» с 11 - летним сроком хранения семян.

Опыт с бобами проводили аналогично опытам с пшеницей, выращенной в почвенной культуре. Семена бобов сорта «Русские черные» высаживали в горшки с землей после двух часов замачивания в воде. Обработку проводили спустя две недели после посадки и повторно – еще через неделю.

При опрыскивании проростков бобов препаратом BION[®] пик С после первой обработки не увеличился (рис.9). Вторая привела лишь к небольшому увеличению термолюминесценции в области пика С и появлению «гербицидного» пика D в области $+5^{\circ}\text{C}$, который свидетельствует о частичном ингибировании фотосинтеза (рис.10). Таким образом, можно констатировать, что препарат BION[®] обладает видоспецифичностью и по-разному действует на однодольные (рекомендован фирмой – изготовителем) и двудольные растения.

В разделе 3.2 описаны опыты с салициловой кислотой – сигнальным веществом в реакциях системной приобретенной устойчивости. Так же, как и в случае с препаратом BION[®], было проведено исследование ее действия на термолюминесценцию при опрыскивании проростков пшеницы и при выра-

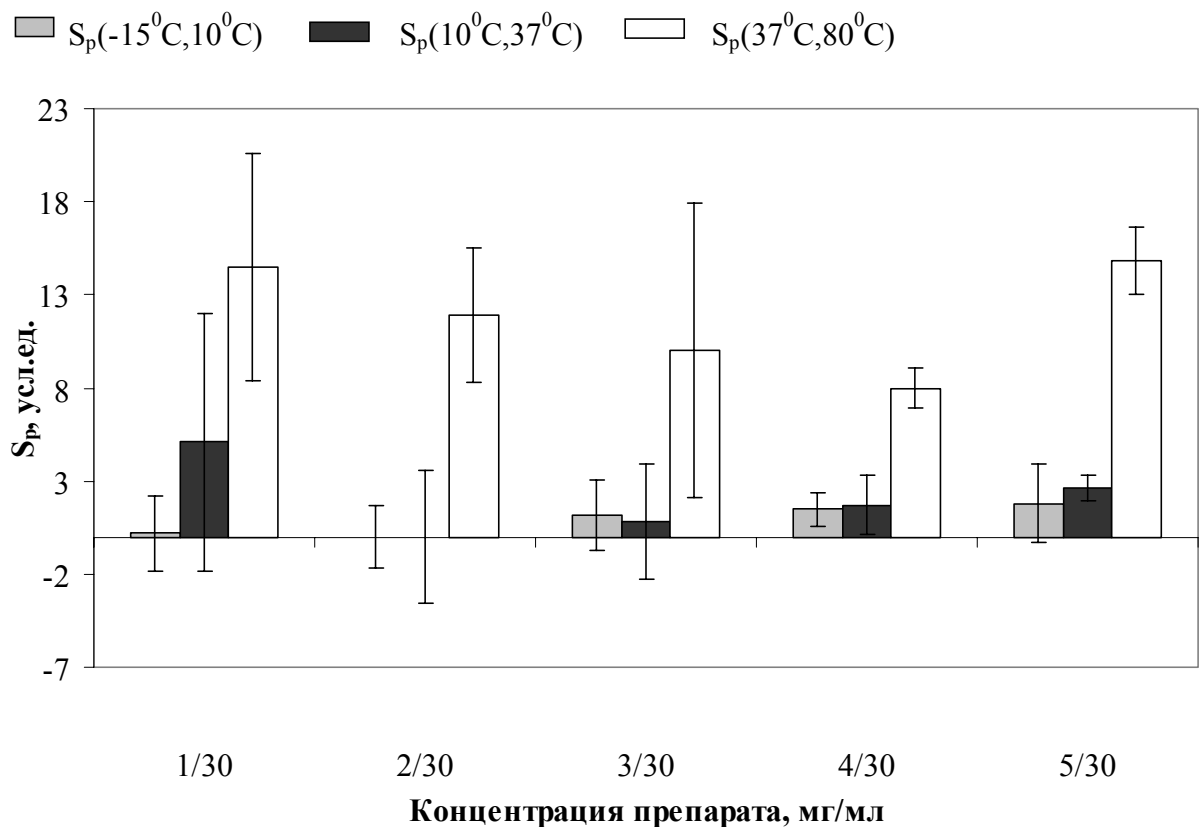


Рис. 8. Зависимость параметра $S_p(T_1, T_2)$ от концентрации препарата BION[®]. Пшеница «Любава» с 1 - летним сроком хранения семян.

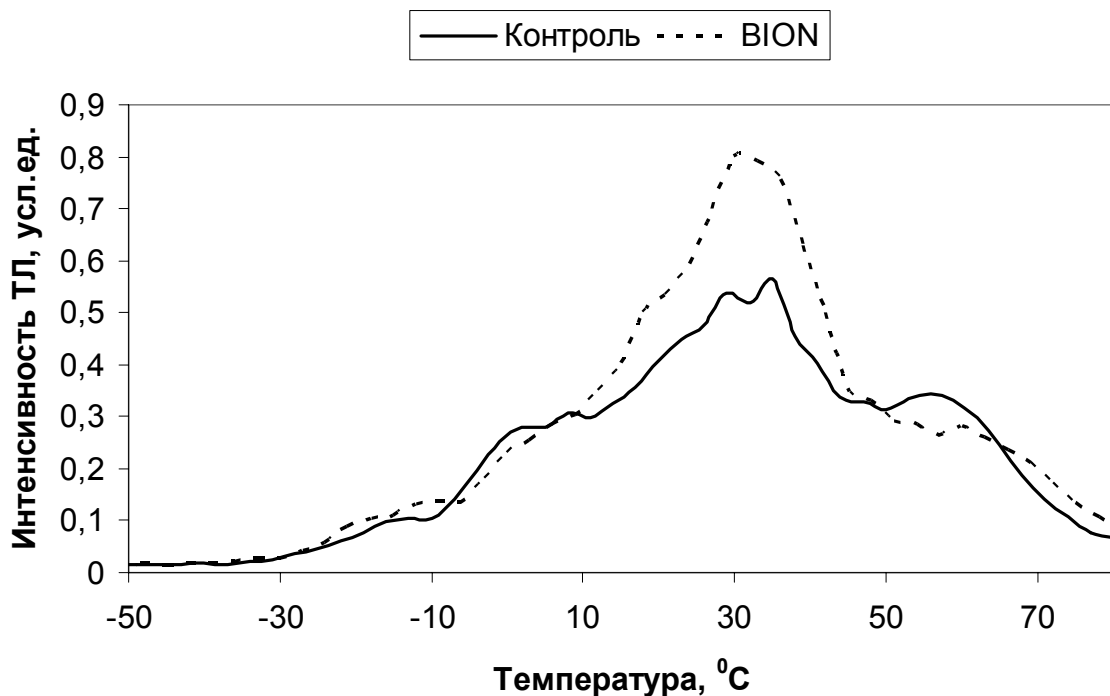


Рис. 9. Кривые термолюминесценции листьев бобов после однократной обработки препаратом BION[®].

щивании их на гидропонике. В опытах использовали семена пшеницы сорта «Любава» со сроком хранения 1 год. Растения опрыскивали раствором салициловой кислоты в разведении 20 мг на 100 мл дистиллированной воды (рН=3,4). Первое опрыскивание проводили для двухнедельных проростков пшеницы, второе – спустя неделю после первого. Измерение термолюминесценции проводили через неделю после обработки.

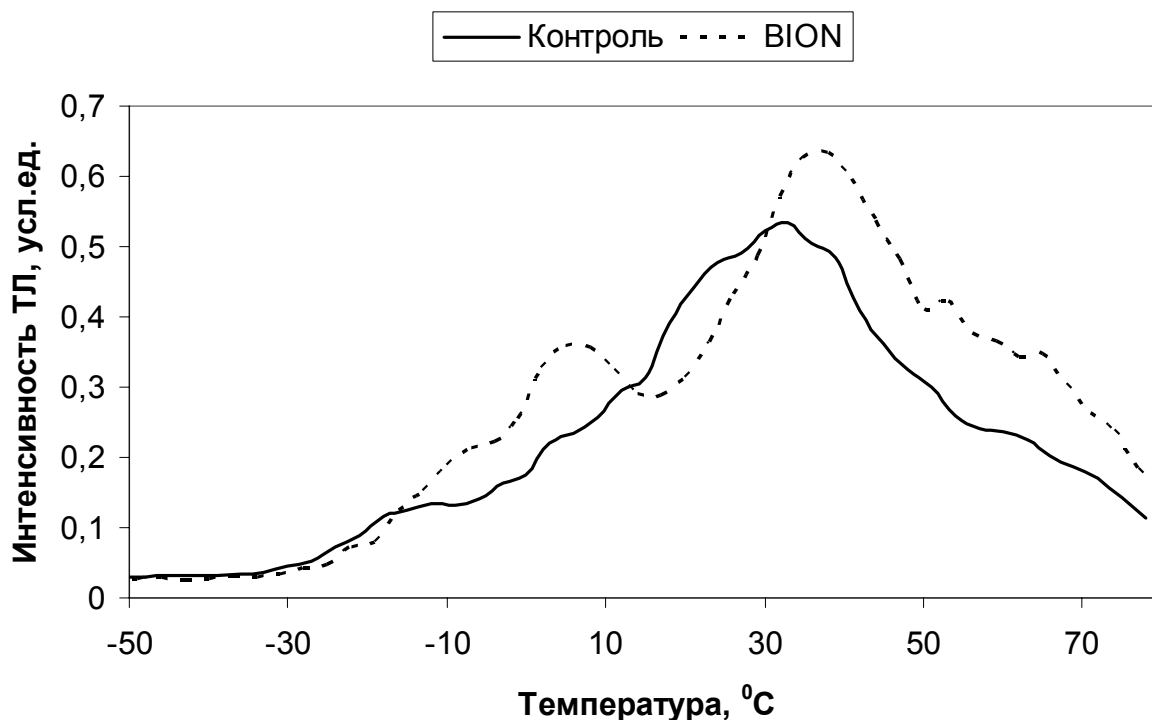


Рис. 10. Кривые термолюминесценции листьев бобов после двукратной обработки препаратом BION®.

Опрыскивание салициловой кислотой вызвало увеличение термолюминесценции в области полосы А, но не изменило интенсивность термолюминесценции в области пика С (рис. 11 и 12).

Увеличение термолюминесценции в области полосы А было отмечено и в случае действия препарата BION® (рис. 4). При неизменной полосе В это свидетельствует о том, что салициловая кислота стимулирует перенос электронов на первичный хиноновый акцептор второй фотосистемы. Стимулирующее действие на фотосинтетический аппарат было отмечено и при изучении воздействия на проростки пшеницы поражения ложномучнистой росой (Юрина и др., 1992). Авторами было показано, что параметр $(F_M - F_T)/F_T$ сначала увеличивается (на 2 – 4 сутки после поражения), а затем уменьшается (5 – 6 день). В этой же работе было отмечено, что поражение грибом сначала (2 – 4 день) приводит к увеличению термолюминесценции в области пика А, а затем (на 5 – 6 день) к ее уменьшению. Был сделан вывод о том, что на ранних стадиях поражения фотосинтетическая активность увеличивается, а затем, возможно, из-за разрушения хлоропластов, уменьшается. Такое стимулирующее действие на работу комплекса второй фотосистемы можно связать с тем, что фотосинтетический аппарат и вторая фотосистема, в частности,

принимают активное участие в генерации активных форм кислорода (Asada, 2006), необходимых для защиты растения от грибной инфекции.

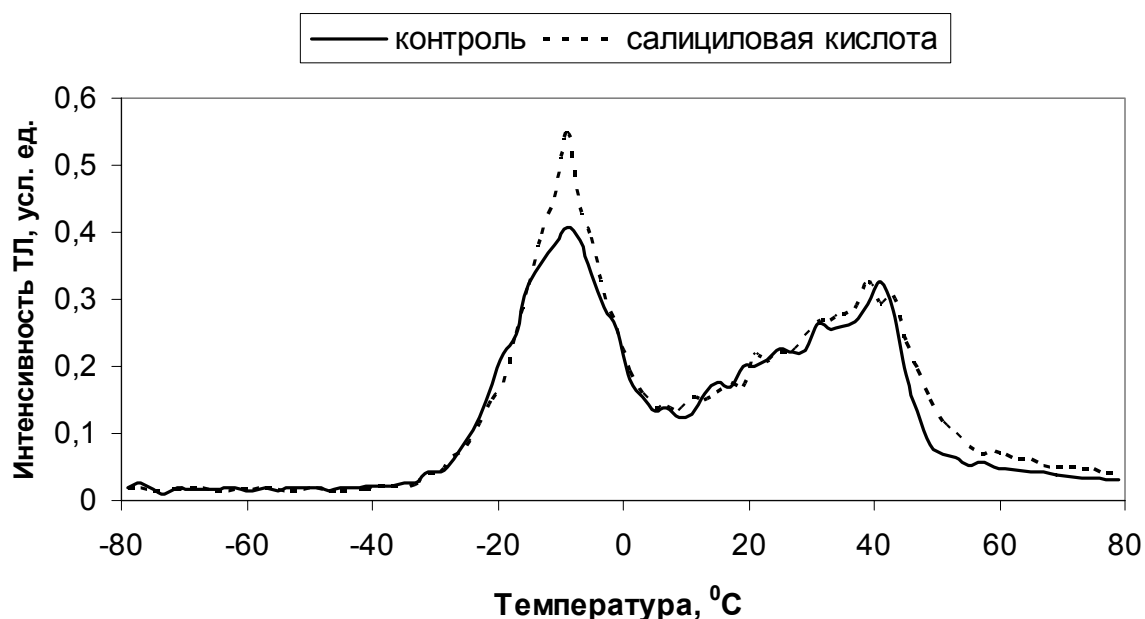


Рис. 11. Кривые термолюминесценции листьев пшеницы после однократной обработки салициловой кислотой.

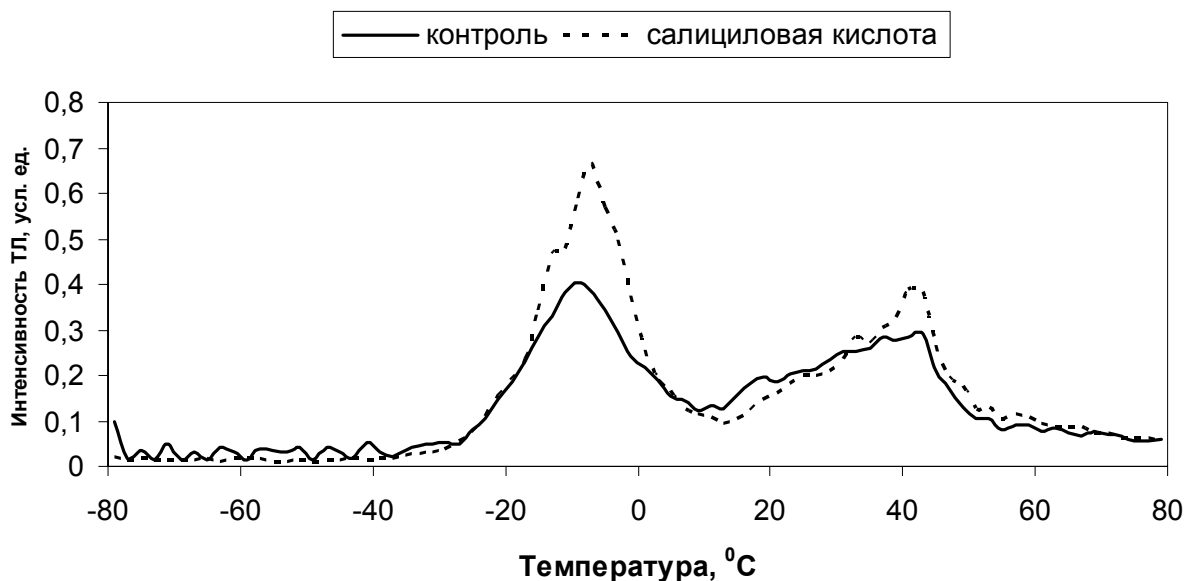


Рис. 12. Кривые термолюминесценции листьев пшеницы после двукратной обработки салициловой кислотой.

В разделе 3.3 приведены результаты опытов с экстрактом из горца гигантского *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai. Ранее было показано, что водный экстракт *Reynoutria sachalinensis* эффективно защищает сельскохозяйственные культуры от фитопатогенных грибов (Daayf et al., 1995, Konstantinidou-Doltsinis, Schmitt, 1998). Механизм действия экстракта предпо-

жительно связан с усилением естественных защитных реакций растений на заражение (индуцированная устойчивость) (Seddon, Schmitt, 1999). Обработка растений экстрактом приводила к увеличению содержания в листьях пероксидазы и хитиназы (Herger, Klingauf, 1990), стимулировала синтез фитолексинов после заражения растений (Daayf et al., 1997).

Проростки пшеницы обрабатывали 1% водным экстрактом из *Reynoutria sachalinensis* два раза – на седьмой и одиннадцатый день после посадки семян. При каждой обработке использовали свежеприготовленный экстракт. Для приготовления препарата брали 2 г сухого порошка *Reynoutria sachalinensis* и добавляли 200 мл дистиллированной воды при 50°C. Суспензию перемешивали в течение 1 часа, фильтровали, и полученный экстракт использовали для опрыскивания растений. Измерения производили через 2-4 дня после второй обработки.

Опрыскивание проростков пшеницы водным экстрактом из *Reynoutria sachalinensis* вызвало небольшое увеличение содержания хлорофилла (таблица 2). Эти данные согласуются с данными (Herger, Klingauf, 1990). Интересен тот факт, что увеличение содержания хлорофилла сопровождалось уменьшением отношения хлорофилл а/хлорофилл b (таблица 2). Известно, что хлорофилл а преимущественно входит в состав коровых комплексов реакционных центров первой и второй фотосистемы, тогда как хлорофилл b преимущественно связан с светособирающим комплексом второй фотосистемы (Vermaas, 1993). Таким образом, уменьшение соотношения хлорофилл а/хлорофилл b в обработанных растениях свидетельствует об увеличении числа светособирающих пигментов в расчете на количество реакционных центров.

Таблица 2. Физиологические и биофизические показатели листьев пшеницы, обработанной водным экстрактом из *Reynoutria sachalinensis*. Все отличия являются достоверными с уровнем значимости 0,05.

Показатель	Контроль	<i>Reynoutria sachalinensis</i>
Содержание хлорофилла мг/г сырой биомассы	0,79	0,83
Отношение хлорофилл а/хлорофилл b	2,80	2,65
Скорость выделения O ₂ , мл O ₂ /(мг хлорофилла в час)	1,10	1,37
(F _M - F _T)/F _T (медленная индукция флуоресценции)	0.89	1.13
P/P ₀ (фотоиндуцированные изменения величины сигнала I ЭПР)	1,0	0,75

Было установлено увеличение фотосинтетической активности (скорости выделения O₂ в расчете на хлорофилл) в листьях растений, обработанных экстрактом из *Reynoutria sachalinensis* (таблица 2). Опрыскивание растений экстрактом привело к увеличению отношения (F_M - F_T)/F_T медленной индукции флуоресценции (таблица 2), которое было обусловлено возрастанием F_M. Увеличение F_M, в свою очередь, может быть связано с частичным снятием нефотохимического тушения флуоресценции за счет более активного синтеза

АТФ и уменьшения градиента протонов на мембране тилакоидов. Увеличение синтеза АТФ, с одной стороны, ведет к ускорению транспорта электронов, а с другой, – к общему увеличению фотосинтетической активности. Об ускорении электронного транспорта между фотосистемами свидетельствует также уменьшение параметра P/P_0 фотоиндуцированных изменений величины сигнала ЭПР I от окисленных реакционных центров первой фотосистемы P_{700}^+ (таблица 2, данные получены Б.В. Трубициным)

Типичные кривые термолюминесценции контрольных и обработанных экстрактом растений приведены на рис.13. У обработанных растений возрас- тала интенсивность термолюминесценции в области пика А и уменьшалась в области пиков В и С. Эти данные указывают на то, что экстракт оказывает стимулирующее действие на кислород-выделяющую систему, ускоряя переход $S_2 - S_3$.

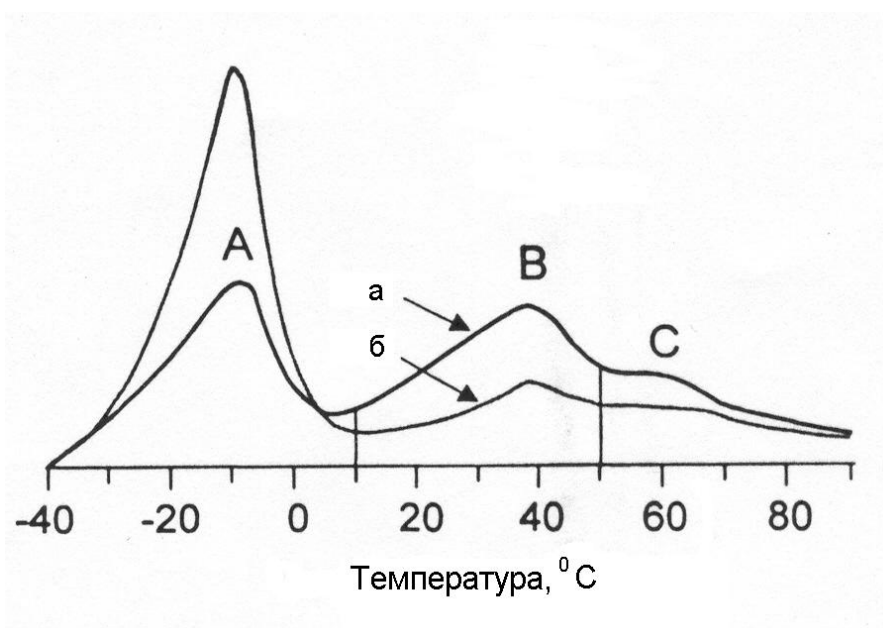


Рис. 13. Термолюминесценция листьев пшеницы, обработанной водным экстрактом из *Reynoutria sachalinensis*: а – контроль, б – обработанные растения.

В разделе 3.4 приведены данные по действию на термолюминесценцию хлоропластов бобов пероксида водорода, – одного из веществ, участвующих в реакциях системной приобретенной устойчивости растений к патогенам.

Увеличение термолюминесценции в области пика А (рис.14) свидетельствует о стимулирующем действии пероксида водорода на комплекс второй фотосистемы (увеличении скорости восстановления первичных хиноновых акцепторов).

В четвертой главе приведены результаты опытов с растениями, находящимися в неблагоприятных экологических условиях: (1) произрастающими вблизи крупных транспортных магистралей и (2) подверженными воздействию солевых антифризов, используемых для борьбы с гололедом.



Рис. 14. Термолюминесценция суспензии хлоропластов из листьев бобов при добавлении пероксида водорода.

В разделе 4.1 исследованы биофизические показатели листьев двух- и трехлетних сеянцев клена остролистного *Acer platanoides L.* в зависимости от расстояния до крупных транспортных магистралей: Университетского проспекта и проспекта Вернадского г. Москвы.

Установлено, что отношение F_M/F_T медленной индукции флуоресценции претерпевает немонотонные изменения по мере удаления от перекрестка проспектов вглубь парка (рис.15, кривая 1). При этом содержание хлорофилла на единицу сырой массы листа монотонно увеличивалось (кривая 2), а количество реакционных центров первой фотосистемы, оцениваемое по величине сигнала ЭПР I от окисленных центров P_{700}^+ , оставалось приблизительно на одном уровне (Караваев и др., 2001). Можно сделать вывод, что низкое содержание хлорофилла и пониженные значения F_M/F_T вблизи перекрестка (5-35 м) обусловлены негативным влиянием выхлопных газов автомобилей, останавливающихся у светофора. Уменьшение F_M/F_T вдали от перекрестка (50-65 м) может быть связано с ослаблением фотосинтеза, обусловленным постепенным затенением сеянцев деревьями (кривая 3, освещенность на уровне сеянцев определяли с помощью фотодиода).

В качестве параметра термолюминесценции использовали относительные светосуммы полосы А ($S_A/S_{общ}$) в интервале температур от $-30^{\circ}C$ до $0^{\circ}C$ и полосы С ($S_C/S_{общ}$) в интервале от $40^{\circ}C$ до $80^{\circ}C$. Установлено, что по мере приближения к перекрестку значения $S_A/S_{общ}$, как и F_M/F_T , уменьшались, а значения $S_C/S_{общ}$ увеличивались (Солнцев и др., 2001). Кинетику фотоиндуцированных изменений величины сигнала ЭПР I характеризовали временем $\tau_{1/2}$ роста сигнала ЭПР I после включения белого света. Было показано, что

значения $\tau_{1/2}$ понижались от 2 мин. для растений, удаленных на расстояние 30 м от перекрестка, до 10 с для самых близких к дороге образцов (Солнцев и др., 2001) (данные получены В.В. Птушенко). Предполагается, что эти изменения также обусловлены неблагоприятным влиянием транспортных магистралей с интенсивным движением автомобилей.

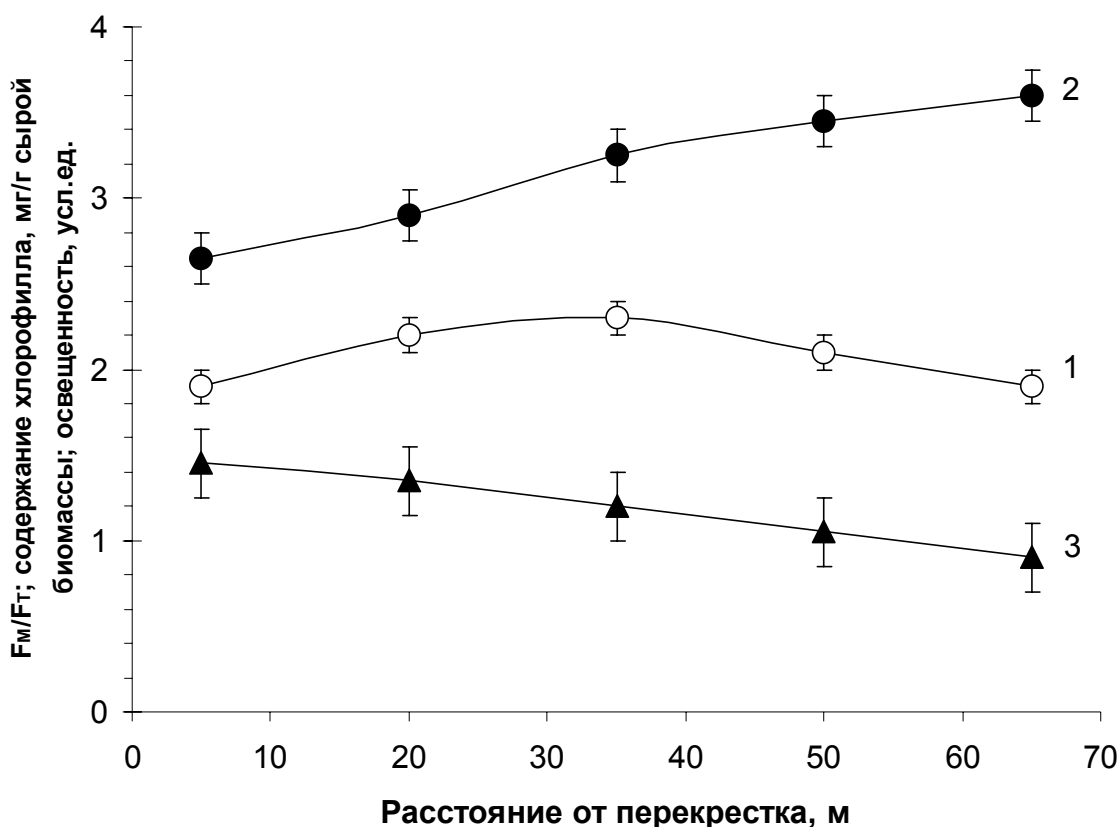


Рис.15. Изменения параметра F_M/F_T медленной индукции флуоресценции (1), содержания хлорофилла в листьях клена (мг на 1 г биомассы) (2) и освещенности листьев (усл. ед.) (3) при удалении вглубь парка от пересечения Университетского проспекта и проспекта Вернадского.

В разделе 4.2 представлены результаты по исследованию действия на фотосинтетический аппарат растений солевого антифриза ХКМ и природного полисахарида хитозана. Хитозан был выбран по двум причинам: из-за его элиситорных свойств (Кривцов и др., 1996) и возможности его использования для фиторемедиации – очистки почв от тяжелых металлов с помощью растений (Азовцева, 2004).

Измерения медленной индукции флуоресценции и термолюминесценции проводили на трехнедельных проростках пшеницы, выращенных в следующих условиях. В смешанные образцы городской почвы, классифицированной как урбанозем – реплантозем (по Строгановой, 1997), массой по 200 г было посеяно по 20 зерен пшеницы сорта «Любава». В первом варианте опыта в почвенный образец был внесен водный раствор солевого антифриза

ХКМ в количестве 0,4% антифриза от массы почвы. Во втором варианте в почву было внесено 10 мл 0,05% раствора хитозана. В третьем варианте в почву были внесены одновременно ХКМ и хитозан в указанных количествах. В качестве контроля использовали почву в естественном состоянии. Хитозан и антифриз вносили в почву три раза с недельным интервалом. Первый раз эти вещества вносили непосредственно перед посадкой семян.

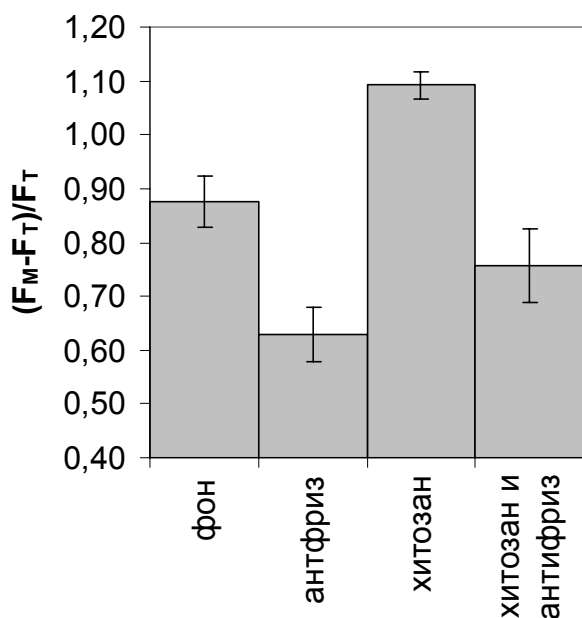


Рис. 16. Изменения параметра $(F_M - F_T)/F_T$ медленной индукции флуоресценции листьев пшеницы при внесении в почву антифриза и хитозана.

Результаты измерений медленной индукции флуоресценции листьев растений, обработанных ХКМ и хитозаном, представлены на рис. 16 (уровень значимости 0,2). При внесении в почву солевого антифриза ХКМ наблюдалось уменьшение параметра $(F_M - F_T)/F_T$ медленной индукции флуоресценции, что свидетельствует о понижении фотосинтетической активности. Внесение в почву хитозана вызывало увеличение значений $(F_M - F_T)/F_T$ (повышению фотосинтетической активности). При одновременном внесении в почву ХКМ и хитозана значения $(F_M - F_T)/F_T$ были понижены по сравнению с фоном, но выше, чем при внесении в почву только антифриза.

Внесение в почву солевого антифриза приводило к уменьшению термолюминесценции в области полосы А и сильному росту пика В (рис.17). При этом происходило смещение температуры максимума пика В в область более высоких температур. Это смещение можно объяснить, исходя из представлений о составной природе пика В (он состоит из пиков В₁ (низкотемпературный компонент) и В₂ (высокотемпературный компонент)). При добавлении в почву ХКМ происходило усиление пика В₂ и ослабление В₁ (рис.17). Можно предположить, что этот эффект вызван частичным блокированием перехода кислород-выделяющей системы из состояния S₂ в состояние S₃. Подтверждением этого предположения служит уменьшение термолюминесценции в области полосы А, источником которой является рекомбинация пары зарядов Q_A⁻S₃⁺. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об угнетающем воздействии солевого антифриза на фотосинтетический аппарат растений.

Внесение в почву хитозана приводило к общему уменьшению интенсивности термолюминесценции листьев растений (рис.17), связанному, как предполагается, с увеличением скорости безизлучательной дезактивации энергии. При одновременном внесении в почву солевого антифриза ХКМ и

хитозана наблюдалась практически такая же кривая термолюминесценции, как и у контрольных образцов. Интенсивности пиков А и В не изменились, но сами они незначительно сместились в область более низких температур. Предполагается, что это связано с восстановлением и даже небольшим ускорением (по сравнению с фоном) скорости перехода кислород-выделяющей системы из состояния S_2 в состояние S_3 .

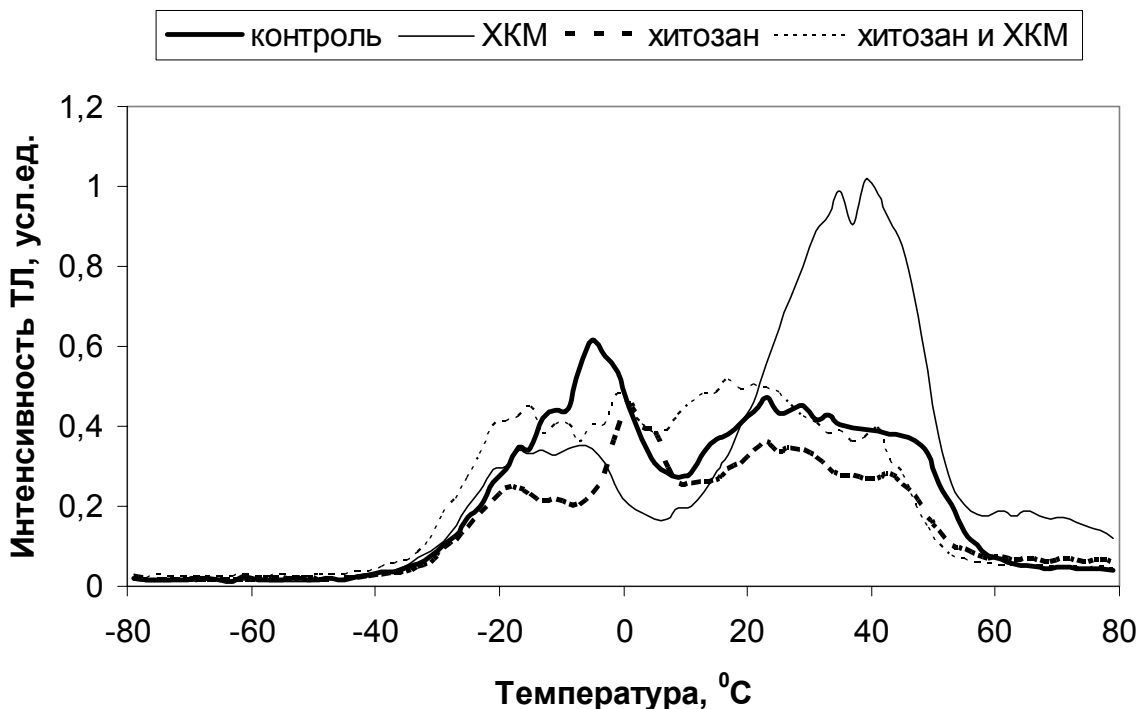


Рис. 17. Термолюминесценция листьев пшеницы при внесении в почву антифриза и хитозана.

Таким образом, внесение в почву хитозана нейтрализует действие солевого антифриза. По всей видимости, это происходит еще в почве, так как их действие на ТЛ листьев растений не аддитивно. По отдельности они уменьшают термолюминесценцию в области пика А, а действуя совместно влияют на него мало. На основании полученных данных можно рекомендовать использование хитозана для компенсации негативного действия солевого антифриза ХКМ на растения.

Выводы

1. Установлены закономерности в изменении люминесцентных показателей листьев растений, обработанных препаратом BION® в зависимости от концентрации, способов и сроков обработки. При малых дозах препарата (от 5 мг до 20 мг на 100 мл) наблюдалось увеличение интенсивности пика А термолюминесценции в области -10°C и параметра $(F_M - F_T)/F_T$ медленной индукции флуоресценции, что свидетельствует о стимулирующем действии препарата на фотосинтетический аппарат.
2. Обработка проростков пшеницы препаратом BION® приводила к увеличению термолюминесценции в области $40-70^{\circ}\text{C}$ (полоса С); у проростков с

большим сроком хранения семян наблюдалась более интенсивная полоса С. Предполагается, что полоса С связана с нарушением целостности мембран при замораживании хлоропластов.

3. Обработка проростков пшеницы экстрактом из горца гигантского *Reynoutria sachalinensis* приводила к увеличению значений $(F_M - F_T)/F_T$ медленной индукции флуоресценции и увеличению пика А термолюминесценции. Эти изменения коррелируют с увеличением фотосинтетической активности (скорости выделения O_2 в расчете на хлорофилл) и свидетельствуют о стимулирующем действии экстракта на фотосинтетический аппарат растений.
4. Установлены закономерности в изменении люминесцентных показателей листьев клена остролистного в зависимости от расстояния до крупных транспортных магистралей. Пониженные значения $(F_M - F_T)/F_T$ медленной индукции флуоресценции и повышенные значения интенсивности термолюминесценции в области полосы С свидетельствуют о негативном воздействии выхлопных газов автомобилей на фотосинтетический аппарат растений на расстояниях вплоть до 30 метров от магистрали.
5. Методами термолюминесценции и медленной индукции флуоресценции показано, что внесение в почву солевого антифриза на основе $CaCl_2$ оказывает негативное воздействие на фотосинтетический аппарат проростков пшеницы, а природного полисахарида хитозана, напротив, стимулирует фотосинтетическую активность. При совместном внесении в почву этих препаратов хитозан компенсирует действие антифриза.

Основные результаты диссертации представлены в следующих публикациях.

1. Солнцев М.К., Караваев В.А., Кузнецов А.М., Птушенко В.В. Трубицин Б.В., Францев В.В., Тихонов А.Н. Изменения биофизических показателей листьев растений в зависимости от удаленности от транспортных магистралей. Тезисы докладов III всероссийской научной конференции "Физические проблемы экологии (Экологическая физика)". Москва, 2001, с.180.
2. Солнцев М.К., Караваев В.А., Кузнецов А.М., Птушенко В.В., Трубицин Б.В., Францев В.В., Тихонов А.Н. Биофизические показатели листьев древесных пород вблизи транспортных магистралей. Тезисы докладов международной конференции "Актуальные вопросы экологической физиологии растений в XXI веке". Сыктывкар, 2001, с.113-114.
3. Караваев В.А., Солнцев М.К., Кузнецов А.М., Полякова И.Б., Птушенко В.В., Трубицин Б.В., Францев В.В., Юрина Т.П., Юрина Е.В., Тихонов А.Н. Изменения медленной индукции флуоресценции листьев клена вблизи транспортных магистралей. Биофизика, 2001, т.46, вып.2, с.381-382.
4. Karavaev V.A., Schmitt A., Solntsev M.K., Yurina T.P., Frantsev V.V., Kuznetsov A.M., Polyakova I.B., Trubitsin B.V. and Tikhonov A.N. Stimulation of photosynthetic activity in wheat leaves treated with aqueous extracts from *Reynoutria sachalinensis*. In: Modern fungicides and antifungal com-

- pounds III (ed. by H.-W. Dehne, U. Gisi, K.H. Kuck, P.E. Russel and H. Lyr). Gelsenkirchen, Verlag Th. Mann, 2002 p.379-385.
5. Solntsev M.K., Karavaev V.A., Yurina T.P., Yurina E.V., Kuznetsov A.M., Polyakova I.B. and Frantsev V.V. Stimulant effect of plant activator BION on photosynthesis and its inhibitory effect on pathogenic fungi. *Plant Protection Science*, 2002, v.38, №2, p.497-501.
 6. Solntsev M.K., Karavaev V.A., Frantsev V.V., Kuznetsov A.M. Effect of plant activator BION on the luminescent characteristics of green leaves. Abstracts of the 6th conference of European foundation for plant pathology "Disease resistance in plant pathology". Prague, 2002, p.87.
 7. Karavaev V.A., Solntsev M.K., Kuznetsov A.M., Polyakova I.B., Frantsev V.V., Yurina T.P. Plant extracts as the source of physiologically active compounds suppressing the development of pathogenic fungi. *Plant Protection Science*, 2002, v.38, №1, p.200-204.
 8. Францев В.В., Солнцев М.К., Караваев В.А. Влияние биологически активного препарата BION на термолюминесценцию листьев бобов и пшеницы. Тезисы докладов V международного симпозиума "Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования". Пушкино, 2003, т.1, с.361-363.
 9. Францев В.В., Солнцев М.К., Караваев В.А. Термолюминесценция листьев растений, обработанных препаратом BION. Тезисы докладов III съезда биофизиков России. Воронеж, 2004, т.2, с.476.
 10. Азовцева Н.А., Смагин А.В., Лазарева Е.В., Францев В.В. Оценка влияния солевых антифризов на экологическое состояние почв и растительного покрова в городской среде. Материалы международной научной конференции «Экология и биология почв». Ростов-на-Дону, 2005, с.12-16.
 11. Францев В.В., Солнцев М.К., Караваев В.А. Влияние препарата BION - активатора системной устойчивости растений против фитопатогенов на термолюминесценцию листьев бобов и пшеницы. Тезисы докладов международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2005», Москва, 2005, т.1, с.56-58.
 12. Solntsev M.K., Frantsev V.V., Karavaev V.A., Yurina T.P., Yurina E.V. Thermoluminescence of wheat leaves treated with the plant activator BION. In: *Modern fungicides and antifungal compounds IV* (ed. by H.-W. Dehne, U. Gisi, K.H. Kuck, P.E. Russel and H. Lyr). The British Crop Protection Council, 2005, p.287-292.
 13. Францев В.В. Возбуждение термолюминесценции зеленого листа 18 нс лазерными вспышками. Тезисы международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2006», Москва, 2006, с.31-33.