

На правах рукописи

УДК 577.355

**ГЛАЗУНОВА СВЕТЛАНА АНДРЕЕВНА**

**ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАСТЕНИЙ,  
ОБРАБОТАННЫХ РОСТРЕГУЛИРУЮЩИМИ ПРЕПАРАТАМИ**

03.00.02. – биофизика

03.00.16 – экология

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата физико-математических наук**

**Москва – 2009**

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

Научный руководитель:

доктор физико-математических наук,  
профессор Владимир Александрович Караваев

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук,  
профессор Энно Куставич Рууге

доктор физико-математических наук,  
профессор Виктор Николаевич Баграташвили

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук  
Институт фундаментальных проблем биологии  
РАН (ИФПБ РАН), г. Пущино

Защита диссертации состоится \_\_\_\_ декабря 2009 года в \_\_\_\_ часов на  
заседании диссертационного совета Д501.002.11 при Московском  
государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991,  
Москва, ГСП-1, Ленинские горы, МГУ имени М.В. Ломоносова, физический  
факультет, аудитория \_\_\_\_.

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

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » ноября 2009 года

Ученый секретарь

диссертационного совета Д501.002.11

доктор физико-математических наук

Г.Б. Хомутов

# 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

## Постановка проблемы, ее актуальность.

Растения – основа существования жизни на Земле. Вырабатываемые в процессе фотосинтеза органические вещества служат продуктами питания человека, сырьем для промышленности, кормом для животных. Детальное изучение механизмов фотобиологических реакций, приводящих к образованию кислорода, непосредственно связано с проблемой управления процессом фотосинтеза, повышения его эффективности и устойчивости к воздействию негативных факторов окружающей среды.

В современных условиях выращивания сельскохозяйственных культур высокая пестицидная нагрузка приводит к ухудшению экологической обстановки. Имеются данные о негативном влиянии пестицидов на защищаемую культуру. Разработка новых экологически чистых препаратов для сельскохозяйственного производства, которые могли бы заменить химические средства защиты растений, является актуальной задачей современной «зеленой» химии и биологии. Одно из направлений в разработке таких препаратов связано с получением растительных экстрактов и изучением их действия на физиологическое состояние растения. В последние годы активно развивается метод так называемой сверхкритической флюидной экстракции (СКФ-экстракции), основанный на использовании диоксида углерода в сверхкритическом состоянии. Преимущество этого метода заключается в сохранении большого количества физиологически активных веществ, зачастую теряемых при других способах экстракции. В этой связи весьма актуальным является получение СКФ-экстрактов из растительного сырья и изучение их действия как на метаболизм и продуктивность сельскохозяйственных культур в целом, так и на функциональную активность их фотосинтетического аппарата.

В настоящее время известно большое число рострегулирующих препаратов, рекомендованных для применения в растениеводстве. Биорегуляторы ускоряют прорастание семян, влияют на свойства биологических мембран и активность ферментов, повышают устойчивость растений к неблагоприятным воздействиям и т.п. Применение нетоксичных природных препаратов позволяет в имеющихся условиях вырастить высокие урожаи сельскохозяйственных культур. Вместе с тем, действие большинства регуляторов роста видо- и сортоспецифично и, кроме того, зависит от способа обработки и условий выращивания культуры. В этой связи актуальной является разработка экспресс-методов, позволяющих оценить

влияние рострегулирующих препаратов на растения и, в том числе, на их фотосинтетический аппарат.

В последние годы для изучения функциональной активности фотосинтетического аппарата активно используются люминесцентные методы исследования, основанные на регистрации медленной индукции флуоресценции и термолюминесценции растений. Эти методы отражают те изменения в фотосинтетическом аппарате, которые происходят на самых ранних стадиях внешнего воздействия. Люминесцентные методы успешно применяются для изучения изменений, происходящих в фотосинтетическом аппарате растений при их обработке различными физиологически активными веществами: гербицидами, фунгицидами, антиоксидантами и, в том числе, растительными экстрактами.

Интерес к медленной индукции флуоресценции (МИФ) обусловлен тем, что в этом явлении в значительной степени проявляются регуляторные процессы, обеспечивающие оптимальное функционирование всей совокупности фотосинтетических реакций. Активно изучается корреляция показателей МИФ с фотосинтетической активностью листа. Метод термолюминесценции (ТЛ), со своей стороны, позволяет изучить характер воздействия исследуемых препаратов на первичные процессы фотосинтеза, связанные с функционированием фотосистемы 2 (мембранный комплекс, в котором происходит светоиндуцированное разделение зарядов в реакционном центре P680, перенос электронов на вторичный переносчик Q<sub>B</sub> и окисление воды). Изучение МИФ и ТЛ растений, обработанных различными физиологически активными веществами, представляется весьма перспективным с точки зрения разработки экспресс-методов оценки состояния растений в изменяющихся условиях окружающей природной среды.

#### **Цель и задачи исследования.**

Цель работы заключалась в изучении влияния различных рострегулирующих препаратов на фотосинтетический аппарат растений люминесцентными методами.

Задачи исследований:

1. Разработка методики экстракции и получение СКФ-экстрактов горца сахалинского *Reynoutria sachalinensis*, известного своими иммуногенными свойствами.

2. Сравнительное изучение люминесцентных характеристик растений, обработанных СКФ-экстрактами *R. sachalinensis*, водным экстрактом этого

растения, а также препаратом Milsana<sup>®</sup>, приготовленным на основе этого растительного сырья.

3. Изучение люминесцентных характеристик растений, обработанных препаратом Эпин-Экстра и кремнийсодержащим препаратом Силиплант в лабораторных условиях, с целью выяснения влияния этих препаратов на фотосинтетическую активность растений.

4. Изучение люминесцентных характеристик растений, обработанных рядом рострегулирующих препаратов, в полевых испытаниях (совместно с РГАУ – МСХА им. К.А. Тимирязева); сопоставление изменений показателя относительного тушения флуоресценции при регистрации МИФ, характеризующего фотосинтетическую активность растений, с изменением конечной продуктивности сельскохозяйственных культур.

5. Изучение с использованием люминесцентных методов влияния западного цветочного трипса (ЗЦТ) на растения огурца; исследование возможности повышения устойчивости растений к ЗПЦ путем обработки растений экстрактом горца сахалинского *R. sachalinensis*.

#### **Научная новизна работы.**

Научная новизна работы заключается прежде всего в разработке методики экстракции, получении и изучении свойств СКФ-экстрактов горца сахалинского *R. sachalinensis*. Показано, что эти экстракты обладают более интенсивным и более продолжительным стимулирующим действием на фотосинтетический аппарат растений по сравнению с исследованными ранее водным и спиртовым экстрактами *R. sachalinensis*. Впервые методом медленной индукции флуоресценции с привлечением метода термолюминесценции установлено влияние ряда рострегулирующих препаратов на структурно-функциональные характеристики фотосинтетического аппарата растений бобов, огурца и ячменя. Также впервые показано, что изменения показателя относительного тушения флуоресценции при регистрации МИФ после обработки ячменя рострегулирующими препаратами в период наиболее интенсивного роста и развития растений сопровождаются определенными изменениями показателей продуктивности культуры.

#### **Практическое значение работы.**

Разработанная в диссертации методика СКФ-экстракции может быть использована при создании экологически безопасных и эффективных препаратов на основе растительного сырья для стимуляции фотосинтетической активности, регуляции роста и защиты

сельскохозяйственных культур от неблагоприятных воздействий. Основой для разработки таких препаратов могут, в частности, служить СКФ-экстракты горца сахалинского *R. sachalinensis*.

Люминесцентные характеристики, основанные на регистрации медленной индукции флуоресценции листьев растений, позволяют получить важную информацию о функциональной активности фотосинтетического аппарата растений. Эти характеристики могут быть использованы для экспресс-диагностики физиологического состояния растений в изменяющихся условиях внешней среды, а также при изучении экологической безопасности разрабатываемых и применяемых на практике препаратов, оптимизации их норм расхода и сроков обработки растений.

#### **Апробация работы.**

Основные результаты диссертации были доложены на VI международном симпозиуме «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования» (Пушино, 2005), IV международной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, 2005), Всероссийской конференции «Нетрадиционные и редкие растения, природные соединения и перспективы их использования» (Белгород, 2006), Всероссийской научно-практической конференции «Роль физиолого-биохимических исследований в селекции овощных культур» (Москва, 2007), V Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, 2007), 2-й международной конференции по зеленой химии (Москва – С.-Петербург, 2008), 9-ом международном симпозиуме по сверхкритическим флюидам (Аркашон, 2009), V международной научно-практической конференции «Сверхкритические флюиды: фундаментальные основы, технологии, инновации» (Суздаль, 2009).

По материалам диссертации опубликовано 15 работ, в том числе 4 статьи в журналах из списка ВАК.

#### **Структура и объем работы**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на \_\_\_\_\_ страницах, содержит \_\_\_\_\_ рисунков и \_\_\_\_\_ таблиц. Список литературы состоит из \_\_\_\_\_ ссылок 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.

**Глава I** диссертации представляет собой обзор литературных данных по применению люминесцентных методов к изучению фотосинтетического аппарата растений.

В **разделе I.1.** дано описание структурно-функциональной организации фотосинтетического аппарата высших растений. В **разделе I.2.** изложены современные представления о природе медленной индукции флуоресценции листьев высших растений, а в **разделе I.3.** описаны основы метода термолюминесценции. **Раздел I.4.** посвящен экстракции, как важнейшего метода выделения из растений физиологически активных соединений. Рассмотрены основные принципы этого метода и способы классификации экстракционных процессов. Выделены основные виды экстракции по типу растворителя, рассмотрены их основные преимущества и недостатки. Более подробно описана экстракция сверхкритическими флюидами, в частности диоксидом углерода в сверхкритическом состоянии.

Основными преимуществами сверхкритических флюидов как растворителей являются:

- сочетание свойств газов при высоких давлениях (низкая вязкость, высокая проникающая способность) и жидкостей (высокая растворяющая способность);
- высокая чувствительность растворяющей способности к изменению давления или температуры; таким образом, изменяя эти параметры, можно менять спектр экстрагируемых веществ;
- быстрый массоперенос, что позволяет сократить время экстракции по сравнению с традиционными методами;
- простота разделения сверхкритических флюидов и растворенных в них веществ при сбросе давления (Залепугин Д.Ю., Тилькунова Н.А. и др., 2006).

В **главе II** дано описание объектов исследований и методик экспериментов. Исследования проводились на проростках бобов *Vicia faba* L. сорта «Русские черные», листьях огурца *Cucumis sativus* L. сорта «Зозуля» и проростках ячменя *Hordeum vulgare* L. сорта «Михайловский». В работе использовался препарат Эпин-Экстра фирмы ННПП «Нэст М» (Россия), гербицид логран и препарат Силиплант – кремнийсодержащее жидкое

органическое удобрение. Использовали также свежеприготовленный водный экстракт горца сахалинского *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai, препарат Milsana<sup>®</sup>, приготовленный на основе этого растительного сырья, и СКФ-экстракты *R. sachalinensis*.

СКФ-экстракты *R. sachalinensis* получали на лабораторной установке SFE-1000M1-2-FMC50 производства Thar Instruments, Inc. /США/. Данная система позволяет проводить экстракцию с использованием диоксида углерода в качестве основного компонента сверхкритического флюида и различных органических растворителей в качестве модификаторов. Экстракцию проводили в следующих условиях: давление 450 бар, температура предварительного нагревателя 55 °С, температура экстракционного сосуда 50 °С, температура сборника фракций 30 °С, скорость потока 50 г/мин. Элюирование проводили в течение 60 минут. СКФ-экстракты получали с использованием либо чистого CO<sub>2</sub> в качестве элюента, либо CO<sub>2</sub> с 10% этанола и 2% этанола в качестве соразтворителя.

Анализ СКФ-экстрактов велся на полупрепаративном сверхкритическом флюидном хроматографе SD-SCFI4 производства компании Thar Instruments, Inc. /США/. Данная модель хроматографа позволяет проводить аналитические исследования по разделению смесей и определению их состава с использованием обычных колонок для высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для измерения индукции флуоресценции листья растений помещали в держатель и адаптировали к темноте в течение 5 мин. Затем производили облучение образца и регистрацию флуоресценции. Флуоресценцию возбуждали широкополосным синим светом (с шириной полосы около 50 нм) интенсивностью около 50 Вт/м<sup>2</sup>, а регистрировали на длине волны 686 нм, соответствующей максимуму в спектре флуоресценции зеленого листа. В качестве параметра МИФ использовали показатель относительного тушения флуоресценции при регистрации МИФ – отношение  $(F_M - F_T)/F_T$ , где  $F_M$  – интенсивность флуоресценции в максимуме индукционной кривой,  $F_T$  – стационарный уровень флуоресценции (см. рис. 1). Ранее было показано, что относительные изменения этого показателя соответствуют относительным изменениям фотосинтетической активности в расчете на хлорофилл (Караваев В.А., 1990).

Для измерения термолюминесценции высечку из листа бобов помещали в держатель и в течение одной минуты освещали красным светом ( $\lambda = 725$  нм) при комнатной температуре (для стандартизации условий

эксперимента). После этого образец быстро охлаждали до  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  и при этой температуре в течение трех минут освещали белым светом. Затем лист охлаждали до  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$  и после этого нагревали до  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  со средней скоростью около  $30\text{ град/мин}$ . В процессе нагрева регистрировали суммарную интенсивность излучения во всем диапазоне длин волн. Анализировали ТЛ в трех температурных интервалах: от  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  (полоса А), от  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  (полоса В) и выше  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  (полоса С).

**Глава III** посвящена изучению влияния на фотосинтетический аппарат растений препаратов на основе горца сахалинского *Reynoutria sachalinensis*.

В разделе **III.1.** исследованы люминесцентные характеристики бобов, обработанных препаратами на основе *R. sachalinensis* в лабораторных условиях. В предварительных экспериментах двухнедельные проростки бобов опрыскивали свежеприготовленным водным экстрактом *R. sachalinensis* до полного смачивания листьев; контрольные растения опрыскивали дистиллированной водой. Установлено увеличение показателя  $(F_M - F_T)/F_T$  МИФ у обработанных растений: на 2-й день после опрыскивания – на 23%, на 10-й день – на 44% по сравнению с контролем. Эти данные свидетельствуют об увеличении фотосинтетической активности растений при их обработке экстрактом горца. У обработанных растений наблюдалось существенное понижение интенсивности ТЛ в области  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , что указывает на повышение эффективности переноса электронов на акцепторной стороне фотосистемы 2 (Иноу Й, Сибата К., 1987). Установлено также уменьшение интенсивности ТЛ при высоких температурах (полоса С), что свидетельствует о повышении устойчивости мембран хлоропластов к низким температурам.

В последующих экспериментах было проведено сравнительное изучение влияния на фотосинтетический аппарат бобов водного экстракта *R. sachalinensis*, препарата Milsana<sup>®</sup>, а также полученных нами сверхкритических флюидных экстрактов горца.

Эксперименты по измерению медленной индукции флуоресценции листьев бобов, обработанных экстрактами *R. sachalinensis*, неоднократно повторяли в разное время года и в различных вариантах обработки растений. При этом абсолютные значения показателя  $(F_M - F_T)/F_T$  для контрольных растений разных посадок изменялись в достаточно широком диапазоне от 0,4 до 0,9. Вместе с тем, относительные изменения этого показателя в различных вариантах обработки бобов экстрактами достоверно

воспроизводились в нескольких сериях экспериментов, проведенных на растениях разных посадок (таблица 1).

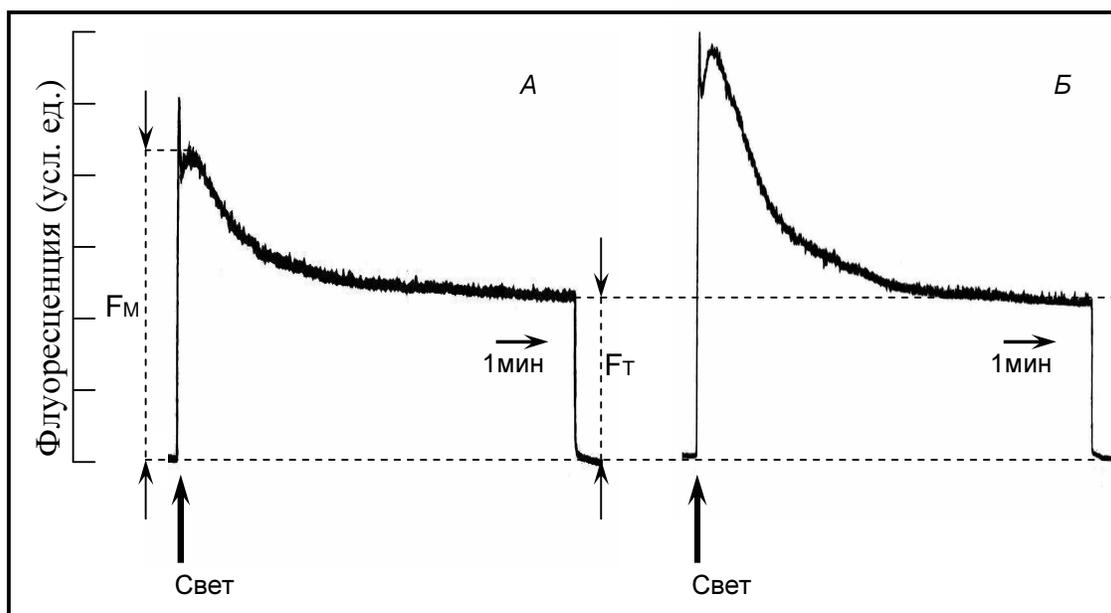
**Таблица 1.** Изменения значений  $(F_M - F_T)/F_T$  медленной индукции флуоресценции листьев бобов после их обработки экстрактами *Reynoutria sachalinensis* и препаратом Milsana<sup>®</sup>.

Вариант обработки	$(F_M - F_T)/F_T$	
	Срок отбора после обработки	
	2-й день	9-й день
Контроль (H <sub>2</sub> O)	100%	100%
СКФ-экстракт <i>R. sachalinensis</i> (CO <sub>2</sub> + 10% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	120%	118%
СКФ-экстракт <i>R. sachalinensis</i> (CO <sub>2</sub> + 2% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	137%	132%
СКФ-экстракт <i>R. sachalinensis</i> (CO <sub>2</sub> )	123%	111%
Водный экстракт <i>R. sachalinensis</i>	125%	106%
Препарат Milsana <sup>®</sup>	85%	124%

Согласно общепринятым представлениям (Krause G.H., Weis E., 1991; Lasar D., 1999), высокие значения интенсивности флуоресценции в первые секунды освещения связаны с восстановлением первичных акцепторов электронов фотосистемы 2. В последующий период начинают работать регуляторные механизмы, обеспечивающие оптимальное функционирование системы фотосинтетических реакций, и флуоресценция уменьшается. Тушение флуоресценции на стадии  $F_M \rightarrow F_T$  обычно подразделяют на фотохимическое и нефотохимическое. Первое связано с окислением первичного акцептора электронов ( $Q_A$ ) фотосистемы 2, второе – с рядом процессов, не связанных напрямую с окислительно-восстановительным состоянием  $Q_A$ . Из них основными являются (1) образование градиента протонов на мембране тилакоидов и (2) перераспределение энергии возбуждения в пользу фотосистемы 1 за счет латеральной миграции части светособирающих комплексов в ту область хлоропласта, где

концентрируются комплексы фотосистемы 1 (Krause G.H., Weis E., 1991; Lasar D., 1999).

Обработка проростков бобов всеми видами СКФ-экстрактов приводила к существенному увеличению значений  $(F_M - F_T)/F_T$  МИФ по сравнению с контролем, что свидетельствует о повышении фотосинтетической активности растений. Следует отметить, что увеличение отношения  $(F_M - F_T)/F_T$  во всех экспериментах было обусловлено возрастанием значений  $F_M$  по сравнению с  $F_T$  (рис. 1). В условиях достаточно интенсивного возбуждающего света, использовавшегося в наших опытах, вклад фотохимического тушения флуоресценции в ее изменение на участке  $F_M - F_T$  невелик (Караваяев В.А., 1990). Следовательно, увеличение значений  $(F_M - F_T)/F_T$  после обработки растений СКФ-экстрактами следует интерпретировать как частичное «снятие» нефотохимического тушения за счет, например, более активного синтеза АТФ в первые секунды освещения и как следствие – уменьшения градиента протонов на мембране тилакоидов. Ускорение процесса фотофосфорилирования, в свою очередь, может быть связано с более быстрым освобождением АДФ и неорганического фосфата в ходе темновых метаболических реакций. Другой возможной причиной увеличения  $F_M$  может быть более интенсивная релаксация процессов, ответственных за тушение флуоресценции, в течение 5-минутной темновой



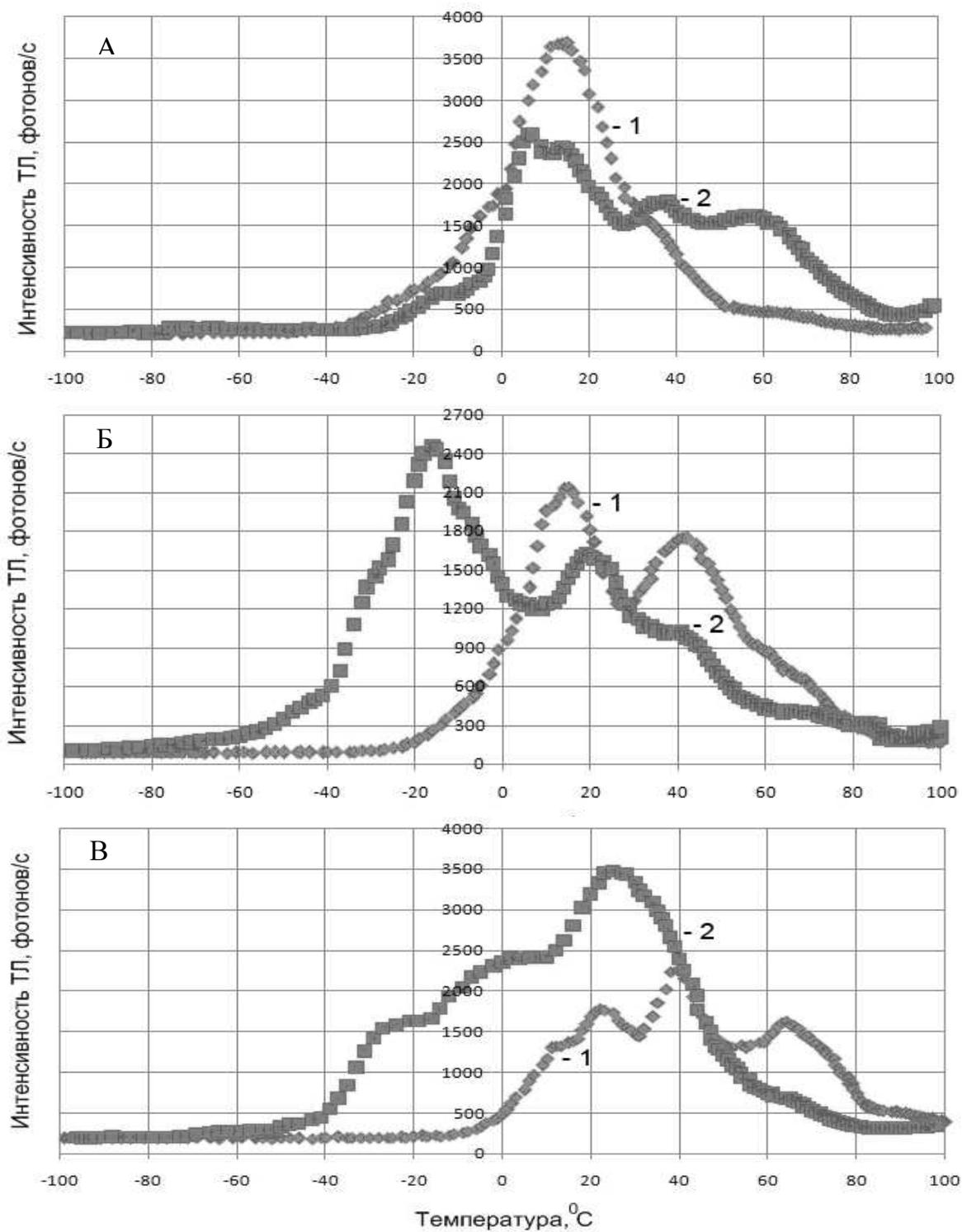
**Рис. 1.** Характерные кривые медленной индукции флуоресценции листьев бобов контрольных растений (А) и растений, обработанных СКФ-экстрактом *Reynoutria sachalinensis* (Б)

адаптации, предшествовавшей регистрации МИФ (снижение градиента протонов на мембране, перемещение светособирающих комплексов в гранальную область тилакоидов и соответствующее увеличение «антенны» фотосистемы 2 и др.).

Максимальное увеличение показателя  $(F_M - F_T)/F_T$  МИФ (на 32–37 % по сравнению с контролем) было отмечено в варианте обработки СКФ-экстрактом, полученным с использованием 2% этанола в качестве соразтворителя. Помимо очевидного различия в составе экстрактов при варьировании состава экстрагента можно предположить, что этанол в небольших количествах способствует эффективному проникновению физиологически активных веществ, содержащихся в экстракте *R. sachalinensis*, внутрь хлоропласта и тем самым усиливает их стимулирующее действие на фотосинтетический аппарат. Однако дальнейшее повышение концентрации спирта при СКФ-экстракции приводило к относительному ослаблению стимулирующего действия экстракта.

Увеличение значений  $(F_M - F_T)/F_T$  (повышение фотосинтетической активности) наблюдалось также при использовании водного экстракта *R. sachalinensis*, однако его стимулирующее действие было не таким продолжительным, как действие СКФ-экстракта. Так, на девятый день после обработки проростков водным экстрактом значения  $(F_M - F_T)/F_T$  практически не отличались от контрольных значений. По сравнению с препаратом Milsana<sup>®</sup>, изготовленным на основе *R. sachalinensis*, значительное стимулирующее действие СКФ-экстрактов развивалось уже в первые дни после обработки растений.

При обработке проростков бобов экстрактом *R. sachalinensis* наблюдалось увеличение интенсивности ТЛ в области отрицательных температур (полоса А), но только в случае, если при получении экстракта использовались небольшие концентрации этанола (2%) или же этанол не использовался совсем (рис. 2). Расчеты показали, что в обоих этих случаях значительно возростала относительная светосумма полосы А (показатель  $S_A/S_{\text{общ}}$ , где  $S_A$  – площадь под кривой ТЛ в интервале от  $-40$  до  $0$  °С,  $S_{\text{общ}}$  – площадь под всей кривой ТЛ), что свидетельствует об увеличении фотосинтетической активности растений (Юрина Т.П., Умнов А.М. и др., 1992).



**Рис. 2.** Характерные кривые термолюминесценции листьев бобов: 1 – контрольные растения; 2 – растения, обработанные СКФ-экстрактами *Reynoutria sachalinensis*. При получении СКФ-экстрактов использовали CO<sub>2</sub> с 10% этанола (А), CO<sub>2</sub> с 2% этанола (Б) и чистый CO<sub>2</sub> (В).

Наиболее сильно эффект увеличения  $S_A/S_{\text{общ}}$  оказался выражен при использовании 2% этанола при получении СКФ-экстрактов, что согласуется с данными, полученными методом МИФ. Кроме того, в вариантах с чистым  $\text{CO}_2$  и  $\text{CO}_2$  с добавкой 2% этанола наблюдалось уменьшение высокотемпературной ТЛ в области полосы С, что свидетельствует о повышении устойчивости мембран хлоропластов к неблагоприятным воздействиям (Солнцев М.К., 1989). При высокой (10%) концентрации этанола, использовавшегося в качестве соразтворителя при получении экстракта, значительно увеличивалась интенсивность ТЛ в области полосы С, что указывает на негативное воздействие больших количеств этанола на структурно-функциональные характеристики мембран хлоропластов. Стимулирующее действие экстрактов *R. sachalinensis* на фотосинтетический аппарат листьев бобов может быть связано с поступлением в клетки листа физиологически активных соединений хиноновой природы, увеличивающих пул акцепторов электрона фотосистемы 2. Об этом, в частности, свидетельствуют полученные нами данные по изучению состава экстрактов методом хроматографии.

В разделе **III.2.** представлены и проанализированы результаты полевых опытов по изучению влияния экстрактов *R. sachalinensis* и препарата Milsana<sup>®</sup> на фотосинтетический аппарат растений ячменя. Опыты проводились в весенне-летний период 2006-2008 гг. на опытном поле РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева. Сводные данные по влиянию исследованных препаратов на медленную индукцию флуоресценции листьев растений представлены в таблице 2.

Опрыскивание растений ячменя экстрактами *R. sachalinensis* приводило к увеличению значений  $(F_M - F_T)/F_T$  МИФ. Наиболее сильное стимулирующее действие экстрактов наблюдалось в течение одной недели после обработки при использовании 1%-го раствора СКФ-экстракта *R. sachalinensis*, полученного с 10% этанола в качестве соразтворителя. При обработке растений 2%-ным раствором того же препарата стимулирующее действие экстракта было слабее. Небольшое уменьшение значений  $(F_M - F_T)/F_T$  при использовании 0,5% и 1% растворов Milsana<sup>®</sup> на 20-й день после обработки может быть связано с негативным влиянием спирта, входящим в состав препарата.

Увеличение фотосинтетической активности в течение трех недель после обработки вегетирующих растений водным и СКФ-экстрактами *R. sachalinensis* способствовало усилению ростовых процессов и, в итоге,

привело к повышению урожайности ячменя. Так, наблюдалось увеличение продуктивной кустистости, а также массой зерна с главного колоса и растения.

**Таблица 2.** Значения  $(F_M - F_T)/F_T$  ( $\pm 0,03$ ) медленной индукции флуоресценции растений ячменя, обработанных экстрактами *R. sachalinensis*.

Время после обработки, сутки	$(F_M - F_T)/F_T, \pm 0,03$					
	Контроль	Водный экстракт <i>R. sachalinensis</i>	Milsana® 0,5% раствор	Milsana® 1% раствор	СКФ-экстракт <i>R. sachalinensis</i> (CO <sub>2</sub> + 10% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH) 1%-й раствор	СКФ-экстракт <i>R. sachalinensis</i> (CO <sub>2</sub> + 10% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH) 2%-й раствор
2	0,48 (100%)	0,59 (123%)	0,55 (115%)	0,47 (98%)	0,60 (125%)	0,52 (108%)
11	0,45 (100%)	0,53 (118%)	0,41 (91%)	0,45 (100%)	0,63 (140%)	0,56 (124%)
20	0,36 (100%)	0,39 (108%)	0,27 (75%)	0,26 (72%)	0,52 (144%)	0,46 (128%)

Наличие определенной корреляции между увеличением значений  $(F_M - F_T)/F_T$  МИФ (увеличением фотосинтетической активности) в первые дни после обработки растений в фазу их наиболее интенсивного роста и развития, с одной стороны, и повышением урожайности, с другой, – свидетельствует о возможности использования метода МИФ для оптимизации норм расхода, сроков и способов обработки растений физиологически активными веществами.

В разделе III.3. описаны опыты по изучению изменений фотосинтетической активности листьев огурца, обработанных экстрактом *Reynoutria sachalinensis* и пораженных западным цветочным трипсом. Значения  $(F_M - F_T)/F_T$  МИФ при поражении уменьшались и составляли 70–90% от контрольных значений, что свидетельствует о соответствующем снижении фотосинтетической активности. У пораженных растений отсутствовал первый «быстрый» пик МИФ, наблюдавшийся у здоровых растений (рис. 3) и характерный для относительно молодых листьев. Таким

образом, можно констатировать, что поражение трипсом в данном случае

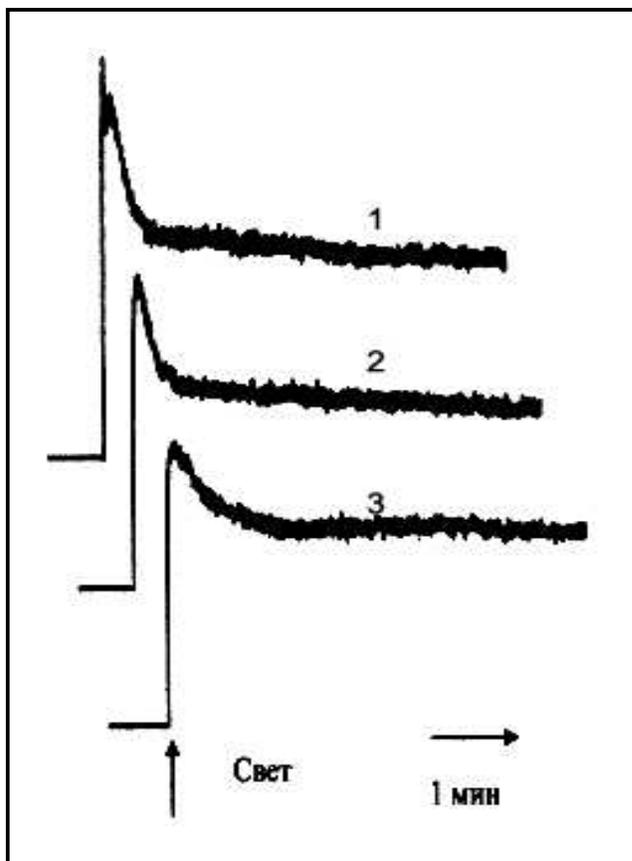


Рис. 3. Характерные кривые медленной индукции флуоресценции листьев огурца: 1 – здоровые растения; 2 – растения, пораженные трипсом (4-й настоящий лист, 20 дней после высаживания личинок); 3 – лист из специальной камеры (значительные следы поражения).

портативного ИК-газоанализатора С2000 (Oldham, Франция). Изменение содержания  $\text{CO}_2$  в камере непрерывно регистрировали в течение 45 мин, вначале при освещении тремя люминесцентными лампами (средняя освещенность около 5000 лк, 15 мин), затем шестью такими лампами (10000 лк, 15 мин), а затем в течение 15-минутного темнового периода. Среднюю скорость  $\text{CO}_2$ -обмена оценивали по угловому коэффициенту соответствующих зависимостей, с учетом данных о вкладе в газообмен биомассы листьев и стеблей (Амелин А.В., 2001).

вызывало ускоренное старение растений.

Положительное действие обработки препаратами проявилось в том, что у обработанных растений, пораженных трипсом, фотосинтетическая активность была в целом выше, чем у необработанных.

В разделе III.4. представлены результаты экспериментов по изучению медленной индукции флуоресценции и  $\text{CO}_2$ -обмена листьев бобов, обработанных экстрактом горца сахалинского *Reynoutria sachalinensis*.

Для измерения  $\text{CO}_2$ -обмена пакеты с проростками бобов помещали в герметизированную камеру из плексигласа объемом 10 л. К воздуху в камере добавляли углекислый газ до концентрации 0,5 %. Содержание  $\text{CO}_2$  измеряли с помощью

**Таблица 3.** Скорость CO<sub>2</sub>-обмена (в мкмолях CO<sub>2</sub> на 1 г сырой массы листьев за 1 ч) и значения (F<sub>M</sub> – F<sub>T</sub>)/F<sub>T</sub> медленной индукции флуоресценции листьев бобов, обработанных экстрактом *R. sachalinensis*.

Вариант обработки	Поглощение CO <sub>2</sub> на свету		Выделение CO <sub>2</sub> в темноте	(F <sub>M</sub> – F <sub>T</sub> )/F <sub>T</sub>
	5000 лк	10000 лк		
H <sub>2</sub> O	3,3 ± 1,8	32,9 ± 2,3 100%	31,0 ± 2,6	0,80 ± 0,05 100%
<i>R. sachalinensis</i>	12 ± 2	41,5 ± 3,3 126%	45,6 ± 3,6	1,00 ± 0,07 125%

Полученные результаты (таблица 3) свидетельствуют об увеличении видимого фотосинтеза и интенсивности темнового дыхания у растений, обработанных экстрактом *R. sachalinensis*. Обращает внимание одинаковое, в процентном отношении, увеличение видимого фотосинтеза на относительно сильном свете (10000 лк) и значения (F<sub>M</sub> – F<sub>T</sub>)/F<sub>T</sub> МИФ. Ранее высокая положительная корреляция между изменениями этих показателей была установлена при снижении фотосинтеза у растений, обработанных ингибитором электронного транспорта диуроном (Караваяев В.А., 1990). Таким образом, показатель (F<sub>M</sub> – F<sub>T</sub>)/F<sub>T</sub> МИФ может быть использован для альтернативной оценки уровня фотосинтетической активности в условиях как ингибирующего, так и стимулирующего воздействия на фотосинтетический аппарат растений.

В **главе IV** изучена медленная индукция флуоресценции листьев растений при использовании рострегулирующих препаратов Эпин-Экстра и Силиплант.

В **разделе IV.1.** рассмотрено влияние препарата Эпин-Экстра на медленную индукцию флуоресценции листьев бобов и огурца при обработке семян и вегетирующих растений. Замачивание бобов в растворе препарата концентрации 0,02 мг/л (примерно соответствует дозе, рекомендованной фирмой-изготовителем) приводило к увеличению значений (F<sub>M</sub> – F<sub>T</sub>)/F<sub>T</sub> по сравнению с контролем. При увеличении времени замачивания значения (F<sub>M</sub> – F<sub>T</sub>)/F<sub>T</sub> возрастали, ускорялся и рост растений (таблица 4). При более низких и более высоких концентрациях Эпин-Экстра стимулирующее действие препарата снижалось. Аналогичные эффекты были установлены при обработке препаратом Эпин-Экстра семян огурца.

**Таблица 4.** Люминесцентные и биометрические показатели проростков бобов в зависимости от времени замачивания семян в растворе препарата Эпин-Экстра, С=0,02 мг/л.

Время замачивания					
2 часа		4 часа		6 часов	
Контроль	Эпин-Экстра	Контроль	Эпин-Экстра	Контроль	Эпин-Экстра
$(F_M - F_T)/F_T, \pm 0,05$					
0,42	0,77	0,47	0,88	0,76	0,97
Высота проростков, мм					
80,6	86,5	96,0	99,4	128,0	169,0

Опрыскивание проростков бобов препаратом Эпин-Экстра также приводило к увеличению значений  $(F_M - F_T)/F_T$ ; этот эффект наблюдался в течение одной недели после опрыскивания.

Таким образом, применение метода МИФ позволило установить стимулирующее действие препарата Эпин-Экстра в концентрации 0,02 – 0,04 мг/л на фотосинтетический аппарат растений при обработке семян и листьев бобов, а также семян огурца. Выявлена концентрация препарата (0,02 мг/л), при которой наблюдался наибольший стимулирующий эффект.

В разделе IV.2. описаны лабораторные опыты по изучению влияния кремнийсодержащего препарата Силиплант на фотосинтетический аппарат листьев бобов. Установлено, что препарат оказывал стимулирующее действие на фотосинтетическую активность растений в первые дни после обработки (таблица 5).

**Таблица 5.** Значения  $(F_M - F_T)/F_T (\pm 0,05)$  медленной индукции флуоресценции листьев бобов, обработанных препаратом Силиплант.

Время после обработки, сутки	$(F_M - F_T)/F_T (\pm 0,05)$	
	Варианты обработок	
	Контроль	Силиплант
1	1,43 (100%)	1,44 (101%)
3	1,20 (100%)	1,46 (122%)
7	0,85 (100%)	1,35 (159%)
9	1,13 (100%)	1,34 (119%)
11	0,88 (100%)	0,87 (99%)

В разделе IV.3. изложены результаты полевых экспериментов по изучению люминесцентных характеристик листьев ячменя, обработанного гербицидом лограном из группы сульфонилмочевины и препаратом Силиплант. Обработка ячменя лограном при норме расхода 8 г/га приводила к уменьшению значений  $(F_M - F_T)/F_T$  МИФ (понижению фотосинтетической активности растений вследствие фитотоксического действия гербицида на культуру). Дополнительная обработка Силиплантом существенно компенсировала этот эффект (оптимальная норма расхода 1,5 л/га, таблица 6).

Необходимо отметить, что в этом эксперименте использование одного только лограна при норме расхода 8 г/га не приводило к достоверному увеличению урожайности. При обработке растений смесью логран 8 г/га + Силиплант 1,5 л/га наблюдалось увеличение урожайности на 20%.

**Таблица 6.** Значения  $(F_M - F_T)/F_T$  ( $\pm 0,03$ ) медленной индукции флуоресценции растений ячменя, обработанных гербицидом лограном и кремнийсодержащим препаратом Силиплант.

Время после обработки, сутки	$(F_M - F_T)/F_T, \pm 0,03$				
	Варианты обработок				
	Контроль	Логран	Логран + Силиплант 1 л/га	Логран + Силиплант 1,5 л/га	Логран + Силиплант 2 л/га
10	0,24	0,16	0,20	0,28	0,22
17	0,28	0,22	0,26	0,34	0,28
24	0,36	0,30	0,32	0,36	0,34

### **Основные результаты и выводы**

1. С применением методов медленной индукции флуоресценции (МИФ) и термолюминесценции (ТЛ) показано, что экстракты горца сахалинского *Reynoutria sachalinensis* оказывают стимулирующее действие на фотосинтетический аппарат растений бобов, огурца и ячменя. Наиболее сильный и наиболее продолжительный эффект наблюдается при использовании препаратов, полученных методом сверхкритической флюидной экстракции.

2. В полевых опытах с растениями ячменя установлено увеличение показателя  $(F_M - F_T)/F_T$  МИФ на 10–40% в первые 1–3 недели после обработки растений в фазу их наиболее интенсивного роста и развития. При этом наблюдается увеличение урожайности ячменя и основных показателей структуры урожая.

3. Поражение растений огурца западным цветочным трипсом приводит к снижению значений  $(F_M - F_T)/F_T$  МИФ (снижению фотосинтетической активности) на 10–30%, и увеличению интенсивности полосы С ТЛ в области температур выше 60 °С (ухудшению структурно-функциональных характеристик мембран хлоропластов). Обработка растений экстрактами *R. sachalinensis* частично компенсирует негативное влияние трипсов.

4. Увеличение значений  $(F_M - F_T)/F_T$  МИФ в опытах с бобами, обработанными водным экстрактом горца сахалинского, в процентном отношении соответствует увеличению скорости поглощения  $CO_2$  в специальных условиях эксперимента (10000 лк, 0,5%  $CO_2$ ).

5. Обработка семян и листьев бобов, а также семян огурца препаратом Эпин-Экстра в концентрациях 0,02 – 0,04 мг/л приводит к увеличению значений  $(F_M - F_T)/F_T$  МИФ листьев растений, что свидетельствует об увеличении фотосинтетической активности, и соответствующему увеличению биомассы растений; наибольший стимулирующий эффект был зарегистрирован при концентрации 0,02 мг/л.

6. Обработка листьев бобов кремнийсодержащим препаратом Силиплант приводит к значительному (на 20–60%) увеличению значений  $(F_M - F_T)/F_T$  МИФ (увеличению фотосинтетической активности растений). Дополнительная обработка Силиплантом растений ячменя в полевом опыте существенно компенсирует негативное действие гербицида лограна на фотосинтетический аппарат растений (оптимальная доза 1,5 л/га).

#### **Публикации по материалам работы**

1. Поздняков С.А., Гунар Л.Э., Караваев В.А., Солнцев М.К., Глазунова С.А., Кузнецова Е.А. Люминесцентные показатели здоровых и пораженных трипсом листьев огурца // Вестник Московского государственного университета леса (Лесной вестник), 2006, №3, с.220–223.

2. Глазунова С.А., Караваев В.А., Покровский О.И., Паренаго О.О., Солнцев М.К., Тишкин М.С., Гунар Л.Э. Люминесцентные показатели листьев бобов *Vicia faba* L., обработанных СКФ-экстрактами *Reynoutria sachalinensis* // Сверхкритические флюиды. Теория и практика, 2009, №1, с.66–77.

3. Глазунова С.А., Птушенко В.В., Гунар Л.Э., Караваев В.А., Солнцев М.К., Тихонов А.Н. Медленная индукция флуоресценции и CO<sub>2</sub>-обмен листьев бобов, обработанных экстрактом *Reynoutria sachalinensis* // Биофизика, 2009, №3, с.495–497.

4. Гунар Л.Э., Мякинников А.Г., Глазунова С.А., Караваев В.А. Фотосинтетическая активность, урожайность и технологические качества ячменя, обработанного экстрактами *Reynoutria sachalinensis* // Известия ТСХА, 2009, вып.2, с.91–96.

5. Караваев В.А., Глазунова С.А., Гунар Л.Э., Мякинников А.Г., Солнцев М.К., Школьников Д.Ю. Люминесцентные и биометрические показатели листьев бобов, обработанных эпином // Материалы VI международного симпозиума «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования». Пущино, 2005, т.1, с.259–261.

6. Глазунова С.А. Караваев В.А., Солнцев М.К., Францев В.В., Школьников Д.Ю., Гунар Л.Э., Мякинников А.Г. Особенности фотосинтетического аппарата листьев бобов, обработанных эпином // Материалы IV международной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений». Минск, 2005, с.59.

7. Поздняков С.А., Гунар Л.Э., Караваев В.А., Глазунова С.А., Солнцев М.К. Изменения фотосинтетической активности листьев огурцов, обработанных экстрактом *Reynoutria sachalinensis* и пораженных трипсом // Тезисы докладов Всероссийской конференции «Нетрадиционные и редкие растения, природные соединения и перспективы их использования». Белгород, 2006, т.2, с.168–171.

8. Поздняков С.А., Гунар Л.Э., Глазунова С.А., Караваев В.А., Солнцев М.К. Люминесцентные показатели листьев огурцов, обработанных экстрактом *Reynoutria sachalinensis* и пораженных трипсом // В сб.: «Роль физиолого-биохимических исследований в селекции овощных культур». Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 75-летию отдела физиологии и биохимии растений ВНИИССОК. Москва, Российский университет дружбы народов, 2007, с.79–84.

9. Дорожкина Л.А., Воронин Д.В., Гунар Л.Э., Караваев В.А., Солнцев М.К., Глазунова С.А. Люминесцентные показатели листьев ячменя, обработанного гербицидом лограном и кремнийсодержащим препаратом «Силиплант» // Материалы V международной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений». Минск, 2007, с.58.

10. Глазунова С.А., Караваев В.А., Солнцев М.К. Особенности фотосинтетического аппарата листьев бобов, обработанных экстрактом *Reynoutria sachalinensis* // Материалы V Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений». Минск, 2007. с.43.

11. Karavaev V.A., Gunar L.E., Myakinkov A.G., Schmitt A., Glazunova S.A., Solntsev M.K. Fluorescent characteristics and yield structure of barley treated with plant extract from *Reynoutria sachalinensis* // In: «Modern fungicides and antifungal compounds V» / Ed. by H.W. Dehne, H.B. Deising, U. Gisi, K.H. Kuck, P.E. Russel, and H. Lyr. Braunschweig: DPG Selbstverlag, 2008, p.285–288.

12. Solntsev M.K., Glazunova S.A., Levykina I.P., Karavaev V.A. Luminescent characteristics of plants treated with  $\beta$ -aminobutyric acid (BABA) // In: Modern fungicides and antifungal compounds V» / Ed. by H.W. Dehne, H.B. Deising, U. Gisi, K.H. Kuck, P.E. Russel, and H. Lyr. Braunschweig: DPG Selbstverlag, 2008, p.303–304.

13. Glazunova S.A., Karavaev V.A., Pokrovskiy O.I., Parenago O.O. Supercritical fluid extract of *Reynoutria sachalinensis* as an environmentally benign agricultural chemical // Abstracts of the 2nd International IUPAC conference on green chemistry. Moscow – St. Petersburg, 2008, p.216–217.

14. Глазунова С.А., Гунар Л.Э., Мякинников А.Г., Караваев В.А., Солнцев М.К. Фотосинтетическая активность и продуктивность ячменя, обработанного экстрактом *Reynoutria sachalinensis* // Материалы VIII международного симпозиума «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования». Москва, 2009, т.2, с.89–91.

15. Glazunova S.A., Karavaev V.A., Pokrovskiy O.I., Parenago O.O. Influence of SF extracts of *Reynoutria sachalinensis* on fluorescence induction of higher plants // Abstracts of the 9<sup>th</sup> International symposium on supercritical fluids. Arcachon (France), 2009, p.169.