

СВЯЗЬ ИНДУКЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЛИСТЬЕВ СОИ *Glycine max* (L.) Merr. С БИОХИМИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ И ПРОДУКТИВНОСТЬЮ

© 2021 г. Д.Р. Шафигуллин*, **, А.А. Байков*, М.С. Гинс*, **, Е.П. Пронина*, В.Ф. Пивоваров*, А.В. Солдатенко*, Е.В. Романова**

*Федеральный научный центр овощеводства, 143080, Московская область, пос. ВНИИССОК, ул. Селекционная, 14

**Российский университет дружбы народов, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8/2

E-mail: shafigullin89@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.03.2020 г.

После доработки 28.10.2020 г.

Принята к публикации 07.11.2020 г.

Изучено влияние условий выращивания на флуоресцентные характеристики листьев впервые интродуцируемых овощных и культивируемых масличных форм сои (*Glycine max* (L.) Merr.) в средней полосе России. Использованы следующие параметры индукции флуоресценции: NPQ (нефотохимическое тушение флуоресценции), qP (фотохимическое тушение флуоресценции), Q_y (действительный квантовый выход фотохимических реакций в фотосистеме II), $Q_{y\max}$ (максимальная квантовая эффективность фотосистемы II), Rfd (коэффициент жизненности). На примере сои в фазе цветения и технической спелости показана прямая связь между нефотохимическим тушением и фактором Rfd ($r = 0.95$) и обратная – показателя F_v с фотохимическим тушением (в фазе цветения и технической спелости $r = -0.89$ и -0.78 соответственно). Исследованы биохимические показатели, проанализированы их взаимосвязи с фотосинтетическими показателями листьев овощных форм сои. Так, накопление антиоксидантов имеет примерно одинаковую умеренную степень корреляционных связей ($r = 0.40$) с величинами $Q_{y\max}$, Rfd , $qP_{\text{стац}}$. В конце вегетации проанализированы отношения фактора жизненности в фазе технической спелости со значениями продуктивности растений сои овощной в фазе полной биологической спелости: с массой растения (включая подземную часть), с числом бобов на растении, с массой семян с растения. Между данными показателями существует устойчивая положительная сопряженность: от $r = 0.78$ (с массой растения и с массой семян с растения) до 0.90 (с числом бобов на растении). Коэффициент жизненности обладает практической значимостью, играя роль количественной характеристики продуктивности растений, что дает возможность использовать РАМ-флуориметрию в оценке физиологического состояния растительного организма и его хозяйственной эффективности.

Ключевые слова: флуоресценция хлорофилла, РАМ-флуориметрия, фото- и нефотохимическое тушение флуоресценции, соя овощная

DOI: 10.31857/S0006302921020150

Применение недеструктивных методов является современным трендом в биофизических исследованиях фотосинтетических процессов [1], в которых особое внимание уделяется явлению люминесценции листьев растений [2, 3]. Известно, что некоторая часть поглощенной энергии, составляющая около 3–5%, излучается в виде флуоресценции, для исследователей эта информация имеет большое значение, поскольку позволяет производить оценку физиологического состояния фотосинтетического аппарата листа [4].

После темновой адаптации листьев в хлоропластах реакционные центры ФС II находятся в открытом состоянии. После включения действующего света реакционные центры «закрываются», причиной чего является восстановление хинонового пула акцепторов электронов в ФС II. Данный процесс обуславливает увеличение флуоресценции хлорофилла *a* [5]. Дальнейшее снижение флуоресценции связано с фотохимическим и нефотохимическим тушением возбуждения молекул хлорофилла *a* в антенных комплексах ФС II [4].

Наиболее современным методом исследования при этом является метод на базе системы РАМ (от англ. Pulse Amplitude Modulation) [6, 7]. В данном подходе флуоресценция возбуждается импульсами света; встроенный детектор регистрирует переменную часть возбужденной флуоресценции [3]. РАМ-флуориметрия применяется

Таблица 1. Происхождение образцов *Glycine max* (L.) Merr. и направления их использования

№ п/п	Образец	Происхождение	Направление
1	Окская	Россия	Масличное
2	Соер-5	Россия	Масличное
3	Gokuwase Nayabusa Edamame	Япония	Овощное
4	Образец В	Япония	Овощное
5	Нордик	Россия	Универсальное
6	Hidaka	Япония	Овощное
7	740-1	Швеция	Овощное
8	Fiskeby III	Швеция	Овощное
9	Tundra	Канада	Универсальное
10	Cha Kura Kake	Япония	Овощное

в фундаментальных и в прикладных исследованиях в физиологии растений, в разнообразных сельскохозяйственных, экологических изысканиях. Главные преимущества этого способа заключаются в неинвазивности, возможности постановки опыта экспресс-методом, восприимчивости показателей к стресс-факторам [8]. Актуальной задачей в биофизике является объяснение динамики флуоресцентных характеристик, выявление взаимных отношений между флуориметрическими признаками и физиолого-биохимическими показателями растительных объектов, а также выделение конкретных показателей, наиболее тонко реагирующих на изменение процессов, протекающих во время фотосинтеза и влияющих на состояние растительного организма [1]. Они представляют собой важные признаки для скрининга состояния фотосинтетической активности растений [6], на которые влияет ряд биотических и абиотических факторов среды.

Ряд работ посвящен изучению индуцируемых изменений флуоресценции хлорофилла и их роли в селекционных программах по созданию новых сортов культурных растений. В исследованиях по ячменю, капусте белокочанной, пшенице авторы достаточно успешно пытались увязать показатели флуоресценции с отдельными элементами продуктивности и даже с урожайностью [9–11]. Подобные статьи, посвященные сое овощной, почти не встречаются. Для нас представляет интерес изучение влияния экологических условий выращивания на активность фотосинтетического аппарата впервые интродуцируемых овощных форм сои в сравнении с традиционными, уже культивируемыми масличными сортами в условиях 55° с.ш.

Цель работы – изучение закономерностей изменений флуоресцентных показателей листьев, а

также установление их взаимосвязей с биохимическими характеристиками (содержание антиоксидантов, углеводов, пигментов, сухого вещества) и продуктивностью растений (масса растения, число бобов на растении, масса семян с растения) у овощных и масличных селекционных форм *Glycine max* (L.) Merr. в середине и на претерминальном этапе онтогенеза сои.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Объектом исследования являлись листья овощных и масличных селекционных форм сои в фазах массового цветения и массовой технической спелости. Овощные формы представлены согласно сформированной модели сортоотбора: по морфологическим и хозяйственным признакам, биологическим особенностям, биохимическим параметрам [12], к универсальным отнесены формы, проявлявшие признаки, присущие как овощным сортам, так и масличным. В статье на рисунках вариант в опыте соответствует порядковому числу в таблице. Большая часть селекционного материала была предоставлена Федеральным исследовательским центром «Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова», также использованы образцы из коллекции Федерального научного центра овощеводства (табл. 1).

Измерения проводили в июле–августе 2018 г. Растения выращивали на опытном поле Федерального научного центра овощеводства (Одинцовский район Московской области). Для определения флуоресцентных характеристик и биохимических показателей отбирали молодые, сформировавшиеся листья на среднем ярусе.

Измерения импульсно-модулированной флуоресценции хлорофилла *a*. Оценку физиологиче-

ского состояния фотосинтетического аппарата проводили с помощью портативного РАМ-флуориметра FluorPen FP110 (Photon Systems Instruments, Чехия).

Флуоресцентный анализ проводили на интактных листьях с вентральной стороны листа, не срывая их с растения, в утреннее время (не позже чем за час до наступления полудня) в соответствии с принятым протоколом освещения *NPQ* для определения нефотохимического тушения флуоресценции [3]. Измерения велись при температуре атмосферного воздуха 20–23°C.

Возбуждение флуоресценции осуществляли светом с $\lambda_{\max} = 455$ нм. Регистрацию флуоресценции проводили в диапазоне длин волн 667–750 нм. Перед началом измерения лист предварительно адаптировали к темноте в течение 30 мин. После этого включали слабый измерительный свет (0.09 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) для определения минимального уровня флуоресценции (F_0) и затем подавали насыщающую вспышку (3000 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) для определения максимальной флуоресценции (F_{\max}^0). После короткого периода темновой релаксации включали действующий свет, на его фоне подавали кратковременные насыщающие вспышки света и измеряли флуоресценцию (5 вспышек с интервалом 12 с). Интенсивность действующего света составляла 1000 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$. Через 60 с освещения действующий свет выключали для наблюдения темновой релаксации, продолжая периодически подавать насыщающие вспышки (3 вспышки с интервалом 26 с).

Определяли значения интенсивности флуоресценции под влиянием измерительного и актинового света и насыщающих вспышек на свету и в темноте: F_0 — начальная флуоресценция в листьях, адаптированных к темноте, F_0' — нулевая флуоресценция в листьях, адаптированных к свету, F_{\max}^0 — максимальная флуоресценция в листьях, адаптированных к темноте, F_{\max}' — максимальная флуоресценция в листьях, адаптированных к свету, F_v — переменная флуоресценция ($F_{\max}^0 - F_0$), F_p — максимальная флуоресценция при возбуждении действующим светом, F_t — стационарная флуоресценция в листьях, адаптированных к свету. На их основе вычисляли следующие показатели флуоресценции: нефотохимическое тушение флуоресценции $NPQ = (F_{\max}^0 - F_{\max}')/F_{\max}'$; фотохимическое тушение флуоресценции $qP = (F_{\max}' - F_t)/(F_{\max}' - F_0')$; действительный квантовый выход фотохимических реакций в ФС II $Q_y = (F_{\max}' - F_t)/F_{\max}'$; максимальная квантовая эффективность ФС II после темновой адаптации

$Q_{y\max} = F_v/F_{\max}^0$. Также был измерен коэффициент жизнестойкости $\PhiС II Rfd = (F_{\max}^0 - F_t)/F_t$.

При определении параметров флуоресценции усреднение проводили по десяти опытным образцам.

Биохимический анализ листьев. Определение содержания фотосинтетических пигментов проводили спектрофотометрическим методом по методике Лихтенталлера [13]. В качестве растворителя использовали 100%-й ацетон. Спектры поглощения измеряли при помощи спектрофотометра Solar PB2201 (ЗАО «СОЛАР», Республика Беларусь).

Определение суммарного содержания антиоксидантов проводили вольтамперометрическим методом на измерительном комплексе «ЦветЯуза 01-АА», разработанном в ОАО НПО «Химвамотика» (Москва) [14]. Экстракцию антиоксидантов проводили бидистиллированной водой при температуре 20°C. Регистрировали площади пиков в четырехкратной повторности. Массовую концентрацию антиоксидантов рассчитывали, используя калибровку по галловой кислоте.

Определение содержания сухого вещества осуществляли методом высушивания навески до постоянной массы [15].

Содержание углеводов анализировали методом Бертрана в модификации Бьери [15].

Определение содержания витамина С проводили йодометрическим методом [16].

Определение содержания фенольных соединений осуществляли методом Фолина–Чокальтеу [17].

При проведении биохимических исследований отбирали среднюю пробу в трехкратной повторности с тех листьев, которые использовали в РАМ-флуориметрии.

Измерение показателей продуктивности растений. Анализ показателей продуктивности растений (масса растения, число бобов на растении, масса семян с растения) определяли по пяти типичным растениям с одного образца при влажности 10%, листья которых использовались в физиологических исследованиях.

Все данные представлены как средние арифметические и их стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение индукции флуоресценции хлорофилла. В соответствии с протоколом измерений *NPQ* было исследовано нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла в листьях различных генотипов. Вначале наблюдалось скачкообразное усиление интенсивности флуоресценции (F_p), затем происходило ее постепенное затухание. Дан-

ная особенность известна как эффект Каутского [2]. После включения актиничного освещения образец освещали повторяющимися насыщающими вспышками, в результате чего флуоресценция возрастала до уровня F'_{\max} , величина которого оказывалась меньше, чем F_{\max} . По мере освещения действующим светом F'_{\max} постепенно снижалась, что объяснимо запуском механизма тепловой диссипации при освещении образца действующим светом [18].

Реакция на свет в фазе цветения не у всех образцов была одинакова. Тем не менее начальная интенсивность флуоресценции перед наиболее сильной насыщающей вспышкой (F_0), а также максимальная (F_{\max}^0) после нее почти у всех образцов совпадали. Однако было замечено, что вариант 740-1 показал нулевую флуоресценцию на 59% больше, а максимальную — на 71.3% выше, отличался низким содержанием хлорофилла $a + b$ — 1.24 мг/г сырой массы листа, при среднем их аккумуляровании у остальных приблизительно на одном уровне — 1.50 мг/г. Большие значения нулевой флуоресценции говорят о слабой передаче энергии возбуждения в светособирающей антенне ФС II. Это может быть обусловлено стрессом, вызванным высокими температурами, которые приводят к повреждению фотосинтетического аппарата из-за влияния света повышенной интенсивности, когда происходит активный синтез АТФ [4]. Более высокие значения флуоресценции в первые секунды освещения действующим светом листьев объясняются более медленным нарастанием нефотохимического тушения флуоресценции. Такое «торможение» определяется невысокой скоростью образования ΔpH , вызывающей нефотохимическое тушение флуоресценции [19]. Между тем проявление какого-либо стресса, вызванного абиотическими или биотическими факторами (болезни растений, повреждение вредителями или засухой), визуально на растениях образца 740-1 не наблюдалось. В данном случае можно предположить в целом влияние экологических условий на фотосинтетические процессы, протекающие в интродуцируемом образце овощного типа, и, в частности, теплового стресса. Показатели F_0 , F_{\max}^0 , F_v у данной линии в более поздней фазе развития не отличались от остальных.

В фазе технической спелости F_0 и F_{\max}^0 по генотипам были схожи, при этом максимальными данные величины были у варианта № 1 (масличный сорт Окская). Данный сорт более раннеспелый по сравнению с другими образцами, он раньше вступил в пору зрелости, и на данном этапе началось частичное старение растений.

После выключения актиничного света флуоресценция начинала меняться. Наблюдались пи-

ки F_{\max} , вызванные кратковременными вспышками, и резкое снижение вслед за ними флуоресценции, обусловленное фотохимическим и нефотохимическим тушением, о чем подробнее будет сказано в следующих разделах работы (рис. 1 и 2).

Сравнивая показатели интенсивности флуоресценции листьев в разные фазы развития растений, можно заметить, что величина F_0 была приблизительно одинаковой; максимальная флуоресценция в фазе технической спелости была выше в среднем на 19%, чем в фазе цветения, что можно объяснить претерминальной стадией в онтогенезе листьев, более высокой интенсивностью света и температурой атмосферного воздуха в фазе образования бобов и семян, что могло повлиять на степень восстановленности пула акцепторов электронов в ФС II.

Как известно, основная причина возникновения нефотохимического тушения — это образование градиента ΔpH и перенос части энергии возбуждения в ФС I. Эволюционные механизмы адаптации растений выработали эффективную систему, при которой происходит «выброс» части поглощенной световой энергии в виде тепла. Это происходит тогда, когда растения очень интенсивно начинают ассимилировать свет или при других стрессовых факторах. Когда после темновой адаптации включается действующий свет, происходит закисление внутритилакоидного пространства и возникает известное явление снижения pH [1].

После включения актиничного света наблюдался рост NPQ по всем образцам. Максимальные значения нефотохимического тушения наблюдались примерно на 68 с после включения действующего света.

На рис. 1 приведены характерные кривые изменения величины нефотохимического тушения по мере освещения листа. В целом образцы имели почти одинаковый ее уровень, за исключением варианта 740-1 (№ 7) и Fiskeby III (№ 8) в фазе цветения: стационарный уровень NPQ в фазе образования цветков у образца № 7 был меньше на 20%, а у образца № 8 — выше на 33%, чем в среднем у остальных вариантов, и равнялся 1.22 и 1.86 соответственно. Интересно, что образец № 8, обладавший максимальной величиной NPQ в фазе цветения, в последующем периоде формирования бобов показал его самое низкое значение (1.15); можно сказать, что в онтогенетическом развитии влияние тепловых стрессовых условий выращивания снизилось до минимума. Во время образования бобов по уровню тепловой диссипации отличался образец В (№ 4), с самым большим значением среди представленных вариантов (1.81). Он отличался медленным ростом NPQ в начале и более быстрым спадом при выключении

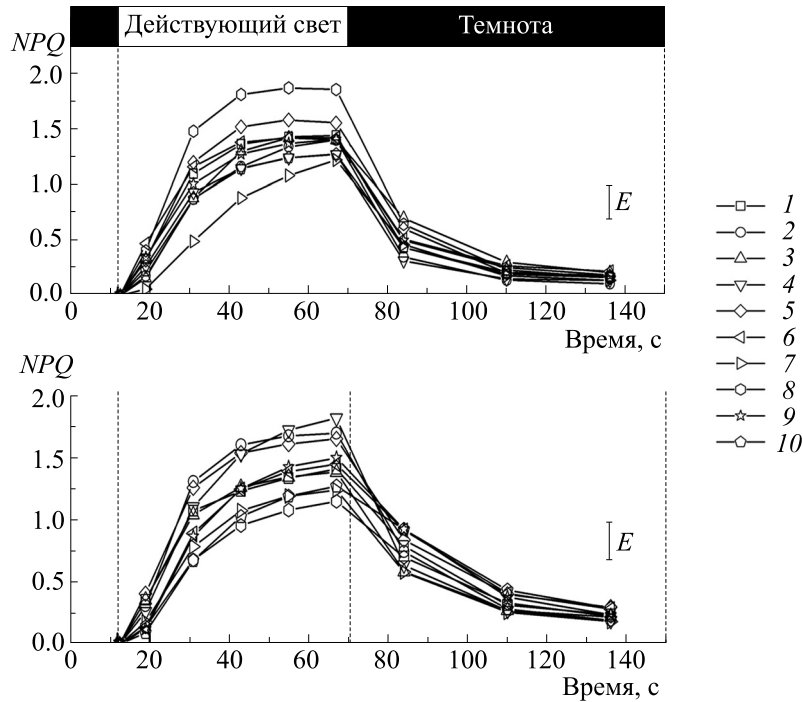


Рис. 1. Нефотохимическое тушение флуоресценции (NPQ) в листьях овощных и масличных форм сои в фазе цветения (вверху) и в фазе технической спелости (внизу). Числа 1–10 обозначают образцы, описанные в табл. 1.

действующего света. Это можно объяснить тем, что он был подвержен, с одной стороны, заболеванию вирусной мозаикой (*Soja virus*), с другой — повреждениями паутинным клещом (*Tetranychus urticae*) средней степени. Аналогичный эффект наблюдали на листьях садовой земляники при поражении их атлантическим паутинным клещом (*Tetranychus atlanticus*) [3].

Сразу после выключения актиничного света нефотохимическое тушение начинает сразу снижаться с достаточно высокой скоростью: приблизительно за 60 с оно возвращается практически в исходную позицию со средним значением 0.19. Почему тепловые потери не опускаются до нуля? Это объясняется фотоингибированием, которое обуславливается излишне сильным излучением, активация АТФ-синтазы вызывает уменьшение ΔpH , что приводит в конечном счете к снижению NPQ [18]. Его уровень после выключения актиничного света связан с релаксацией процессов регулируемого нефотохимического тушения, преимущественно с энергозависимым (qE) механизмом. В целом можно сделать вывод о том, что соя обеих селекционных форм имела стабильные значения NPQ . В фазе цветения и технической спелости медианные значения NPQ совпадали. Аномалий в кинетике нефотохимического тушения не выявлено.

Изучение эффективности фотохимических реакций. Значения фотохимического тушения явля-

ются важнейшими показателями эффективности световых стадий фотосинтеза, поскольку именно эта часть световой энергии может быть непосредственно использована в фотохимических реакциях. В качестве параметров фотохимического тушения мы использовали $Q_{y_{max}}$ и Q_y .

За начальную точку кривых квантового выхода взят показатель F_v/F_{max}^0 , характеризующий максимальный квантовый выход фотохимического разделения зарядов в ФС II. В фазе цветения он составлял в среднем 0.76 у масличных и 0.78 у овощных форм, что может говорить о состоянии стресса, вызванном частичным повреждением фотосинтетического аппарата. Такая реакция растений может объясняться влиянием яркого дневного света на растения со слабой системой фотозащиты. В фазе технической спелости значение $Q_{y_{max}}$ восстановилось, у овощных и масличных форм было одинаковым и составило в среднем уже 0.81, подтверждая нашу гипотезу о том, что стрессовое воздействие, связанное с ингибирующим светом, прекратилось. Относительная ошибка не превосходила 10%.

Стационарное значение показателя Q_y , отвечающего за фактический квантовый выход ФС II на свету, в фазе цветения у образца 740-1 было наименьшим среди всех изученных вариантов (0.10) с существенным отставанием от остальных в два раза, причиной чему является, возможно,

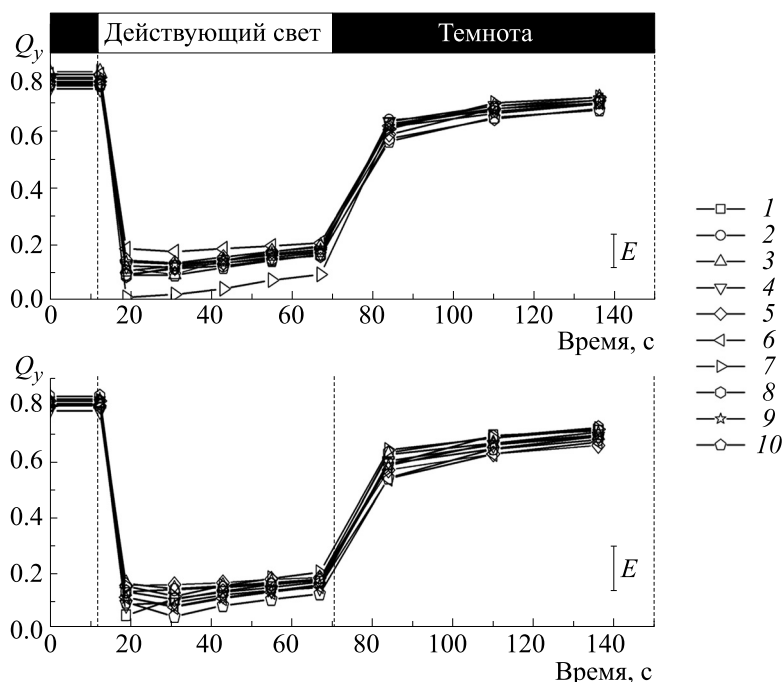


Рис. 2. Эффективный квантовый выход ФС II (Q_y) в листьях овощных и масличных форм сои в фазе цветения (вверху) и в фазе технической спелости (внизу). Числа 1–10 обозначают образцы, описанные в табл. 1.

более слабое развитие фотосинтетического аппарата в целом и чувствительность к стрессовым воздействиям. Любопытно, что этот же генотип в последующей фазе развития показал максимальный квантовый выход как после темновой адаптации (0.83), так и на свету (0.20) и, как следствие, повышенную продуктивность. Он обладал наибольшими значениями массы 1000 семян и коэффициента хозяйственной эффективности урожая среди представленных форм – 320.2 г и 51.4% соответственно.

После включения действующего света происходило значительное падение эффективности фотохимических реакций. Такие изменения обуславливаются окислением реакционных центров, под действием насыщающего актиничного света и процессом восстановления первичных хиннонных акцепторов электронов Q_A [3]. Затем, примерно начиная с 20-й секунды, возобновляется медленный рост Q_y . Усиление синтеза АТФ и восстановленного НАДФ-Н приводит к запуску цикла Кальвина–Бенсона, понижению интенсивности флуоресценции и возбуждению нефотохимического (NPQ) и фотохимического (qP) тушения флуоресценции в антеннах ФС II [20].

После прекращения подачи актиничного света, во время темновой релаксации, наблюдался резкий рост эффективности фотохимических реакций, особенно сильно это явление проявлялось в первые 15 с. После этого увеличение Q_y несколько замедлялось, но выходило на стационар

до конца периода регистрации протокола, едва не дотягивая до стартового уровня F_v/F_{max}^0 . Уменьшение Q_y по сравнению с $Q_{y,max}$ объясняется ингибирующим влиянием насыщающих вспышек на фоне действующего света на листовой аппарат сои. Показатели эффективности фотохимических реакций в разные фазы развития растений сои были схожи, за исключением упомянутого варианта 740-1 (рис. 2).

Нами был проведен анализ взаимосвязей некоторых флуоресцентных показателей в разные фазы развития растений (рис. 3). Найдена интересная особенность: и в фазе цветения, и в фазе технической спелости наблюдалась почти прямая зависимость тепловой диссипации с фактором жизненности – значение коэффициента корреляции было одинаково в обе фазы и составило 0.95. Казалось бы, величина Rfd , как одного из показателей относительного тушения и косвенно отражающий фотосинтетическую активность листа [21], должна быть обратно пропорциональна нефотохимическому тушению, поскольку чаще всего фотохимическое и нефотохимическое тушение развиваются и относятся друг к другу в противоположном соотношении [3]. Почему мы наблюдаем этот аномальный эффект в обе фазы онтогенеза листьев сои овощного типа? Отчасти это объяснимо тем фактом, что при относительно стабильном уровне F_{max}^0 менялись значения F'_{max} и F_t , которые

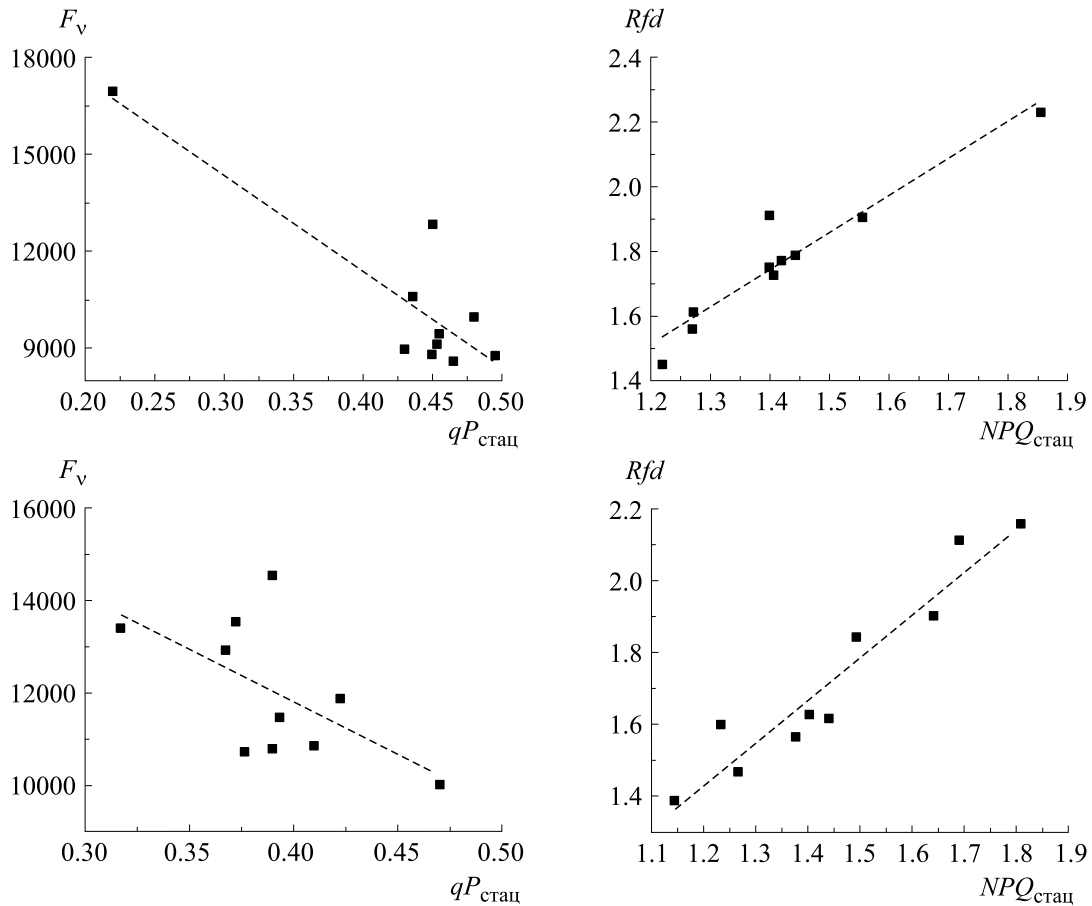


Рис. 3. Связь фотохимического (qP) и нефотохимического (NPQ) тушения с переменной флуоресценцией (F_v) и коэффициентом жизненности (Rfd) в листьях сои овощной в фазе цветения (вверху) и в фазе технической спелости (внизу).

положительно коррелировали между собой, что и повлекло увеличение обоих показателей.

Вариабельная флуоресценция имела отрицательную зависимость от фотохимического тушения флуоресценции – в фазе цветения и технической спелости $r = -0.89$ и -0.78 соответственно. F_v определяется разницей между максимальной флуоресценцией (F_{max}^0) и нулевой (F_0) после темновой адаптации и в значительной степени коррелирует с максимальным квантовым выходом ФС II $Q_{y_{\text{max}}}$ [2]. Вероятно, уменьшение F_v вызывает усиление $qP_{\text{стац}}$ по причине того, что терминальная и нулевая флуоресценция после адаптации к действующему свету имели отрицательную взаимосвязь с F_{max}^0 и F_0 . Наблюдение практически обратной пропорциональности вариабельной флуоресценции уровню фотохимического тушения может говорить об нетривиальном поведении растения. Можно сказать, что такая реакция обусловлена внешними условиями выращивания, достаточно нетрадиционными для этой культу-

ры, поскольку она формировалась длительное время в условиях короткого дня, в отличие от Центрального района Европейской части России, который характеризуется длинным световым периодом. Как будет указано ниже, в конечном итоге этот фактор не повлиял на продуктивность растений.

Сравнение флуоресцентных показателей листьев овощных и масличных форм. В целях подтверждения разницы флуоресцентных признаков у исследованных нами образцов была проведена иерархическая кластеризация полученных данных, представленных на рис. 4. В кластерный анализ был включен пул флуоресцентных показателей, а именно: F_v , F_p , $Q_{y_{\text{max}}}$, Rfd , $qP_{\text{стац}}$, $NPQ_{\text{стац}}$, а также их поведение на свету и релаксация в темноте. Устойчивость кластерного анализа была основана на результатах, полученных при использовании метода групповых средних, с расчетом евклидова расстояния.

В фазе цветения (рис. 4) была замечена интересная тенденция образования отдельного кла-

стера, состоящего только из масличных форм (Окская и Соер-5). Остальные образцы формировали кластеры в зависимости от флуоресцентных показателей, находясь ближе или дальше друг от друга. Установлено, что образец 740-1 (№ 7) не составил кластер, поскольку его характеристики не укладывались ни в один из имеющихся и не обладали схожестью с представленными генотипами. Образец В (№ 4) по флуоресцентным показателям вошел в отдельный кластер, который включал два субкластера — собственно сам образец и подгруппа с масличными формами. Исследуемые нами масличные линии — это созданные сорта для Нечерноземной зоны России, выделенные из исходного материала, адаптированного к местным условиям в течение достаточно продолжительного периода, овощные же формы интродуцируются впервые, и, как следствие, их физиологические показатели в целом и флуоресцентные характеристики в частности отличались от стандартных (зерновых) образцов, выращиваемых в этой зоне много ранее. Почему масличные формы выделились в отдельный кластер? Это объясняется тем, что они более раннеспелые (сумма активных температурных единиц меньше на 80–90°C), менее чувствительны к длине дня и, естественно, не подвергались целенаправленному отбору в условиях 55° с.ш., что сказалось на физиолого-биохимическом отличии образцов овощного биотипа, сформированных в Китайском центре [22, 23].

Сравнивая показатели флуоресценции в фазе технической спелости (рис. 4), можно отметить распад отдельного кластера масличных форм. Соер-5 и образец В показали сходные данные и образовали гомогенный кластер аналогично предыдущей фазе, что отразило их постоянство флуориметрической природы. В фазе технической спелости значительно меняются биофизические характеристики, почти нивелируется какое-либо различие в зависимости от селекционной направленности сорта. Возможно, это влияние предуборочной фазы развития, подготовки растений к биологической спелости, и, таким образом, растения «переключались» на формирование урожая.

Связь флуоресцентных показателей листьев овощных форм и биохимических характеристик. Определена связь важнейших биохимических характеристик с биофизическими, такими как: F_v , $Q_{y_{max}}$, Rfd , $qP_{стак}$, $NPQ_{стак}$. Выбор в пользу именно этих показателей объясняется тем, что они в основном отражают фотосинтетическую активность листьев и физиологическое состояние растений в целом.

Суммарное содержание водорастворимых антиоксидантов коррелировало с $Q_{y_{max}}$, Rfd , $qP_{стак}$ приблизительно на одинаковом уровне. Это объ-

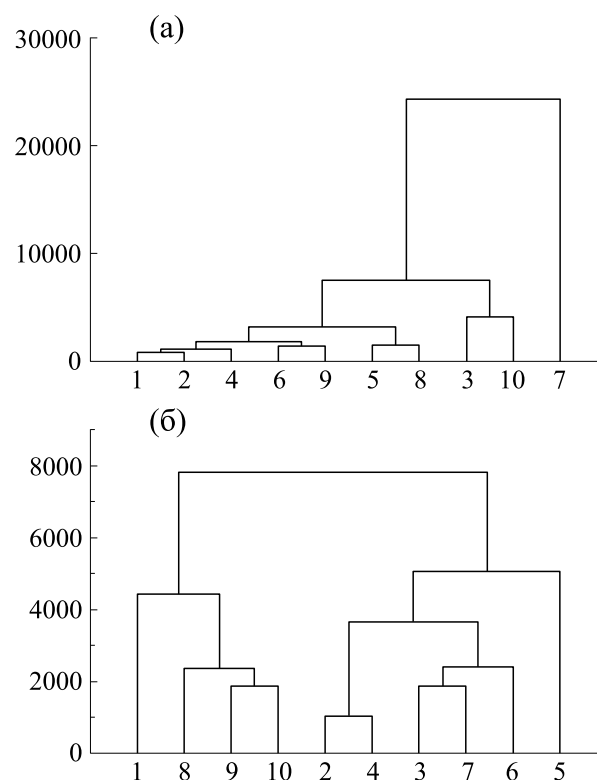


Рис. 4. Дендрограмма кластерного анализа показателей флуоресценции листьев овощных и масличных форм сои в фазе цветения (вверху) и технической спелости (внизу).

яснимо, по-видимому, тем, что с усилением фотохимического тушения часть запасенной энергии в форме АТФ уходит на обеспечение энергетики синтеза антиоксидантов на случай защиты организма от стресса. В свою очередь, связь накопления фенольных соединений, обладающих иным метаболическим путем синтеза, отличалась от взаимного влияния водорастворимых антиоксидантов и биофизических характеристик. В нашем опыте они имели обратную зависимость с F_v , Rfd , $NPQ_{стак}$. Схожей природой корреляций обладают углеводы: с их увеличением наблюдалось уменьшение значений Rfd , $NPQ_{стак}$, $qP_{стак}$ в обе фазы.

Содержание пигментов в фазе цветения не обладало значимыми достоверными взаимосвязями с флуоресцентными показателями, за исключением положительной с Rfd и $NPQ_{стак}$. Это обусловлено тем, что увеличение содержания хлорофилла вызывает в известной степени усиление фотосинтетической активности [2]; при этом сопряженность содержания пигментов с тепловой диссипацией определяется в нашем случае почти прямой зависимостью $NPQ_{стак}$ с коэффициентом жизненности (рис. 3). Любопытно, что в фазе технической спелости это влияние утратилось — из-

Таблица 2. Сопряженность флуоресцентных показателей листьев овощных форм сои с биохимическими характеристиками

№ п/п	Биохимический параметр	Фаза развития растений	Показатели флуоресценции хлорофилла				
			F_v	$Q_{y_{max}}$	Rfd	$qP_{стак}$	$NPQ_{стак}$
1	Суммарное содержание водорастворимых антиоксидантов, в сырой массе	В фазе цветения	-0.09 ± 0.23	0.41 ± 0.21	0.41 ± 0.22	0.39 ± 0.22	0.27 ± 0.23
2	Суммарное содержание фенольных соединений, в сухой массе	В фазе технической спелости	-0.68 ± 0.17	-0.11 ± 0.23	-0.40 ± 0.22	0.22 ± 0.23	-0.34 ± 0.22
3	Содержание витамина С, в сырой массе	В фазе цветения	-0.22 ± 0.23	-0.18 ± 0.23	0.67 ± 0.18	0.10 ± 0.23	0.73 ± 0.16
		В фазе технической спелости	-0.59 ± 0.19	-0.79 ± 0.14	0.56 ± 0.19	0.37 ± 0.22	0.68 ± 0.17
4	Содержание углеводов, в сырой массе	В фазе цветения	0.65 ± 0.18	0.11 ± 0.23	-0.41 ± 0.22	-0.66 ± 0.18	-0.32 ± 0.22
		В фазе технической спелости	0.02 ± 0.24	0.36 ± 0.22	-0.66 ± 0.18	-0.27 ± 0.23	-0.63 ± 0.18
5	Содержание хлорофилла <i>a</i> и <i>b</i> , в сырой массе	В фазе цветения	-0.24 ± 0.24	0.22 ± 0.23	0.44 ± 0.21	0.27 ± 0.23	0.39 ± 0.22
		В фазе технической спелости	-0.01 ± 0.24	-0.52 ± 0.20	0.12 ± 0.23	-0.31 ± 0.22	0.26 ± 0.23
6	Содержание каротиноидов и ксантофилов	В фазе цветения	-0.38 ± 0.22	0.04 ± 0.24	0.41 ± 0.21	0.30 ± 0.22	0.43 ± 0.21
		В фазе технической спелости	0.07 ± 0.24	-0.51 ± 0.20	0.14 ± 0.23	-0.37 ± 0.22	0.24 ± 0.23
7	Содержание сухого вещества	В фазе технической спелости	0.05 ± 0.24	0.54 ± 0.20	-0.89 ± 0.11	-0.32 ± 0.22	-0.83 ± 0.13

менились пути использования фотохимической энергии запасенной в форме АТФ, которая стала потребляться на образование бобов, и наблюдалась обратная корреляционная связь с $Q_{y_{max}}$.

Накопление сухого вещества листьев обладало положительной корреляционной связью с максимальной квантовой эффективностью ФС II; с ее увеличением величины Rfd и $NPQ_{стак}$ снижались. Причиной этого является перераспределение энергетических потоков: часть энергии, которая использовалась на накопление сухого вещества в вегетативных органах, начала расходоваться на его аккумуляцию в образующихся плодах и семенах. Детальная картина корреляционных

взаимосвязей флуоресцентных показателей листьев овощных форм с биохимическими характеристиками дана в табл. 2.

Связь фотосинтетической активности с продуктивностью растений овощных форм. Коэффициент жизнестойкости («vitality index») показывает взаимодействие работы фотосистемы II с процессами темновой фазы [24, 25]. Rfd можно рассматривать как фактор потенциальной фотосинтетической активности [21, 26]. Мы изучали взаимозависимость фотосинтетической активности $(F_{max}^0 - F_t)/F_t$ в фазе технической спелости растений с показателями продуктивности ис-

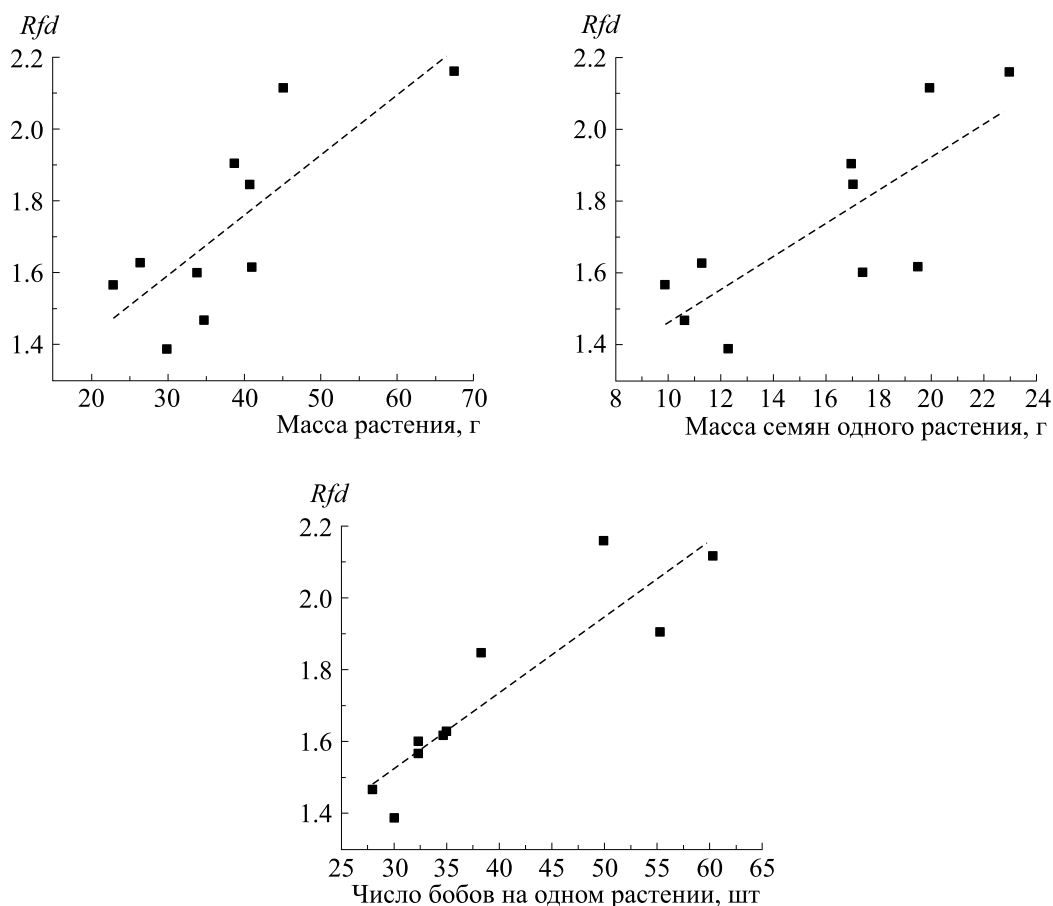


Рис. 5. Связь показателя коэффициента жизненности (Rfd) с показателями продуктивности растений сои овощной в фазе полной биологической спелости.

следуемого объекта: массой растения, массой семян с растения, числом бобов на растении. Эффективность фотохимических реакций (Rfd) в фазе интенсивного образования плодов составляла 1.69, что соответствует средним значениям данной культуры [27].

Связь коэффициента жизненности с показателями продуктивности растений была хоть и схожей, но имела различия (рис. 5). Высокая степень зависимости наблюдалась с числом бобов на растении ($r = 0.90$). Эта закономерность обуславливается тем, что обычно в нормальных, нестрессовых условиях растение закладывает максимально возможное число бобов, которые обладают слабой вариабельностью в пределах выборки. Следовательно, фенотипическая изменчивость не влияла на изменение картины взаимосвязей с Rfd . Эксперименты показывают, что фактическое число бобов часто стремится к теоретически ожидаемому, в отличие от числа семян на растении и, как следствие, от их массы [12]. С массой растения, включая подземную часть, и с массой семян

с растения взаимосвязь была несколько меньшей: по обоим показателям находилась на одном уровне ($r = 0.78$). Чем это объяснимо? Масса растения и семян подвержена сильной модификационной изменчивости, являясь количественным признаком, подчиненным множеству внешних и наследственных факторов; последние, в свою очередь, определяются большим числом неаллельных генов [12]. Несмотря на то что число бобов на растении потенциально может быть очень велико, часто в них имеются abortивные, недоразвитые семена, с очень низкой массой, в итоге приводящее к понижению общей продуктивности — интегрального показателя.

Наши исследования подтверждают тот факт, что показатель Rfd в том числе отражает ассимиляцию углекислого газа: значения коэффициента жизненности пропорциональны развитию элементов структуры урожая. Таким образом, показатель флуоресценции $(F_{\max}^0 - F_t)/F_t$ является свя-

зующим звеном между параметрами световой и результатами темновой стадии фотосинтеза.

ВЫВОДЫ

1. Найдена сильная корреляция между величиной $NPQ_{\text{стац}}$, характеризующей тепловую диссипацию в листьях, и фактором жизнеспособности Rfd , а также обратная зависимость вариабельной флуоресценции с фотохимическим тушением $qP_{\text{стац}}$ в середине и в конце онтогенеза.

2. Установлены различия флуоресцентных показателей между овощными и масличными селекционными формами *Glycine max* (L.) Merr. на ранних стадиях развития растений (в фазе цветения), что проявилось в образовании обособленного кластера последних. В дальнейшем в онтогенезе по мере развития генеративных органов этот эффект нивелируется. Предварительно можно сделать вывод о том, что данные показатели флуоресценции овощных форм сои частично отражают селекционные признаки, характерные для иных условий происхождения.

3. Определены взаимосвязи флуоресцентных показателей с биохимическими характеристиками, в частности, с накоплением антиоксидантов: с показателями Qu_{max} , Rfd , $qP_{\text{стац}}$ сопряженность была приблизительно равной на умеренном уровне, а также с содержанием сухого вещества: с его увеличением происходило снижение фактора жизнеспособности Rfd и тепловых потерь $NPQ_{\text{стац}}$.

4. Исследовано отношение показателя флуоресценции $(F_{\text{max}}^0 - F_t)/F_t$ с элементами продуктивности растений. Отношения индекса жизнеспособности с элементами продуктивности были схожими, при этом наибольшая степень корреляции обнаружена с числом бобов на растении. Анализ взаимосвязей фактора жизнеспособности, как важнейшего показателя индукционных изменений, с элементами структуры урожая дает возможность определять потенциальную хозяйственную эффективность растений сои овощной современными инструментальными методами на более ранних этапах онтогенеза.

Данные исследования методом РАМ-флуориметрии показывают перспективы применения флуоресцентного метода для оценки физиологического состояния фотосинтетического аппарата растений, предварительного прогноза накопления определенных биохимических соединений и продуктивности.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Благотворительного фонда В. Потанина (грант № ГПК-19/17).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. O. A. Kalmatskaya, et al., *Biophysics* **60** (1), 135 (2015).
2. V. V. Ptushenko, O. S. Ptushenko, and A. N. Tikhonov, *Biochemistry (Moscow)* **79** (3), 260 (2014).
3. A. A. Baikov, et al., *Biophysics* **58** (2), 234 (2013).
4. В. Н. Гольцев и др., *Физиология растений* **63** (6), 881 (2016).
5. D. Lazár, *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics* **1412** (1), 1 (1999).
6. *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, Ed. by G. C. Papagerogiou (Springer, 2004).
7. W. W. Adams and B. Demmig-Adams, in *Chlorophyll a Fluorescence* (Springer, Dordrecht, 2004), pp. 583–604.
8. Y.F. Liu, M.F. Qi, and T.L. Li, *Plant Sci.* **196**, 8 (2012).
9. E. Nalborczyk and H. J. Czembor, *Cereal and root-crop systems in Central Europe*, №. REP-5295. CIMMYT (1992).
10. M. H. Kalaji and P. Guo, *Photochem. Res. Progr.* **29**, 439 (2008).
11. M. H. Kalaji and S. Pietkiewicz, *Plant Breed. Seeds Sci.* **49**, 19 (2004).
12. D. R. Shafigullin, et al., *Rus. Agric. Sci.* **46** (3), 213 (2020).
13. H.K. Lichtenthaler, *Methods Enzymol.* **148**, 350 (1987).
14. А. Я. Яшин, Я. И. Яшин и Н. И. Черноусова, *Пищевая промышленность*, № 2, 10 (2006).
15. А. И. Ермаков и др., *Методы биохимического исследования растений* (Агропромиздат, Л., 1987), т. 143.
16. W. U. Wen, et al., *J. Anhui Agric. Sci.* **21** (2009).
17. E. A. Ainsworth and K. M. Gillespie, *Nature Protocols* **2** (4), 875 (2007).
18. O. P. Samoilova, V. V. Ptushenko, I. V. Kuvykin, et al., *BioSystems* **105**, 41 (2011).
19. G. H. Krause and E. Weis, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 313 (1991).
20. L. Alonso, et al., *Remote Sensing* **9** (8), 770 (2017).
21. В. А. Караваев, И. О. Белогрудов и А. К. Кукушкин, *Биофизика* **34** (4), 710 (1989).
22. Н. И. Вавилов, *Тр. прикл. ботан. и селекции* **16** (2), 248 (1926).
23. D. R. Shafigullin, et al., *Rus. Agric. Sci.* **46** (5), 447 (2020).

24. Л. Э. Гунар, В. А. Караваев и Р. В. Сычев, Изв. ТСХА, № 2, 78 (2008).
25. Л. Э. Гунар, А. Г. Мякинников, С. А. Глазунова и В. А. Караваев, Изв. ТСХА, № 2, 91 (2009).
26. В. А. Караваев, Л. Э. Гунар, А. Г. Мякинников и др., Биофизика 57 (4), 662 (2012).
27. A. Djekoun and C. Planchon, Euphytica 55 (3), 247 (1991).

Relationship of Inductional Changes of Fluorescent Leaf Indices of *Glycine max* (L.) Merr. with Biochemical Characteristics and Productivity

D.R. Shafigullin*, **, A.A. Baykov*, M.S. Gins*, **, E.P. Pronina*, V.F. Pivovarov*,
A.V. Soldatenko*, and E.V. Romanova**

*Federal Scientific Vegetable Center, ul. Selectzionnaya 14, pos. VNISSOK, Moscow Region, 143080 Russia

**Peoples' Friendship University of Russia, ul. Miklukho-Maklaya 8/2, Moscow, 117198 Russia

The influence of growing conditions on the fluorescent characteristics of leaf of the soybean first time introducing vegetable and cultivating oilseed forms has been studied in the European part of Russia. It was used the following parameters of fluorescence induction: NPQ (non-photochemical fluorescence quenching), qP (photochemical quenching of fluorescence), Q_y (quantum yield of photochemical reactions in PS II), $Q_{y\max}$ (maximum quantum efficiency of PS II), Rfd (coefficient of vitality) in our work. We showed a direct relationship between non-photochemical quenching and Rfd factor in the flowering phase and R6-stage ($r = 0.95$), and the inverse relationship between the F_v and photochemical quenching (in the flowering phase and technical ripeness $r = -0.89$ and -0.78 , respectively) in the flowering phase and R6-stage. It was studied the biochemical parameters of leaves, analyzed their relationships with photosynthetic indicators of leaves of vegetable forms: the antioxidant accumulation had approximately the same moderate degree of correlation ($r = 0.40$) with $Q_{y\max}$, Rfd , $qP_{s,s}$. At the end of the growing season, we analyzed the relationship of the vitality factor in the R6-stage with the values of the vegetable soybean plant productivity in the phase of full biological ripeness: with the plant mass, including the underground part, with the number of beans per plant, with the seed mass per plant. There is a stable positive contingency between these indicators: from $r = 0.78$ (with the plant mass and with the seed mass per plant) to 0.90 (with the number of beans per plant). The vitality factor has a practical orientation, playing the role of a quantitative characteristic of plant productivity, which makes it possible to use PAM-fluorimetry in assessing the physiological state of plant organism and its economic efficiency.

Keywords: chlorophyll fluorescence, PAM fluorometry, photochemical and nonphotochemical fluorescence quenching, vegetable soybean