

Оценка эффективности лазерного метода обнаружения стрессовых состояний *Leonurus cardiaca* L

Н. М. Батухтин

Санкт-Петербургский
государственный
электротехнический
университет «ЛЭТИ»
им. В.И. Ульянова (Ленина)

nikitakind@yandex.ru

М. М. Дегтерева

Санкт-Петербургский
государственный
электротехнический
университет «ЛЭТИ»
им. В.И. Ульянова (Ленина)

mmromanovich@etu.ru

Е. Левин

Санкт-Петербургский
государственный
электротехнический
университет «ЛЭТИ»
им. В.И. Ульянова (Ленина)

e_levin@etu.ru

Аннотация. В работе проведена оценка эффективности лазерного метода обнаружения стрессовых состояний *Leonurus cardiaca* L. Приведены результаты экспериментальных исследований спектров флуоресценции *Leonurus cardiaca* L. в нормальном и стрессовом состояниях. Показано, что при длинах волн возбуждения флуоресценции 405 и 515 нм воздействие стрессовых факторов может приводить к увеличению интенсивности флуоресценции хлорофилла и изменению формы спектра флуоресценции.

Ключевые слова: фотосинтез; флуоресценция; хлорофилл; стресс растений; *Leonurus cardiaca* L.; лазер

I. ВВЕДЕНИЕ

Биотический и абиотический стресс вызывают значительное снижение содержания хлорофилла в листьях растений, что дает возможность ранней диагностики заболеваний растений [1]. Вызванные стрессом изменения в составе фотосинтетических пигментов меняют оптические характеристики листьев, которые указывают на функционирование растений и наличие стресса [2]. Раннее выявление задержки роста растений напрямую связано с фундаментальным процессом фотосинтеза. Флуоресценция хлорофилла является мерой эффективности фотосинтеза и, следовательно, может использоваться как индикатор здоровья и жизнеспособности растительности [3].

Свет наиболее сильно влияет на развитие растений. На ранних стадиях роста сложно обнаружить стрессовые состояния по внешнему виду. Флуоресцентный анализ является быстрым и высокочувствительным методом, обеспечивающим точную оценку фотосинтетической активности и позволяющим выявлять различные стрессовые воздействия на растения [4].

Энергия света, поглощаемая листьями, может быть использована в фотосинтезе, рассеиваться в виде тепла, а также выделяться в виде флуоресценции [5]. Из-за того, что данные процессы протекают в условиях конкуренции, измеряя спектры флуоресценции хлорофилла, можно получить информацию об эффективности фотосинтеза [6]. Спектр флуоресценции листьев характеризует излучение хлорофилла *a*. Хлорофилл *b* люминесцирует в красной области только в растворе; в листе энергия полностью передается хлорофиллу *a*.

Для исследования был выбран пустырник *Leonurus cardiaca* L., так как содержит в себе большое количество полезных биологически активных веществ, а также является востребованным объектом для исследования из-за большого количества хлорофиллов в нем. Пустырник обладает выраженными седативными свойствами, а также оказывает гипотензивное и кардиотоническое действие. Настой пустырника применяют при кардиосклерозе, стенокардии, при сердечно-сосудистых неврозах, начальной стадии гипертонии, эпилепсии и легких формах базедовой болезни. Применяют как мочегонное средство, лечат истерию и нервное состояние.

В данной работе представлены методология измерения спектров флуоресценции *Leonurus cardiaca* L., а также несколько параметров, которые могут предоставить информацию о различных процессах фотосинтеза [7–9].

II. ОПИСАНИЕ УСТАНОВКИ И ПРОВЕДЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА

Для обеспечения растений PPFD 200 мкмоль·м⁻²·с⁻¹, а также для реализации освещения в соотношениях красного (К), зеленого (З) и синего (С) излучения по значению PPFD 33 % К+33 % З+33 % С+УФ+ДК, был разработан стенд с боксами для каждого вида освещения. Стенд подключен к автоматическому поливу, боксы отделены перегородками, для изоляции растений от постороннего излучения. Для увеличения коэффициента отражения на перегородки нанесено алюминиевое покрытие. Каждый источник излучения подключен к таймеру, определяющему периодичность и длину светового дня. Во всех боксах поддерживались одинаковая температура, влажность и минеральный состав раствора. В каждом боксе расположено 15 образцов *Leonurus cardiaca* L., производилась выборка из 2 образцов для каждого вида освещения. Выбирались образцы с наилучшим темпом роста, средней массой и площадью листьев, учитывалась мощность корневой системы. Для измерения спектров флуоресценции растений использовался лазер с излучением на длине волны 405 нм. Спектры флуоресценции образцов ДНаТ измерялись также при помощи лазера с излучением на длине волны 515 нм для сравнения эффективности метода измерения.

В состав установки для измерения флуоресценции листьев, схематично изображенной на рис. 1, входят:

- лазеры, излучение на длине волны 405 и 515 нм;
- драйвер лазерного диода LSR-PS-I;
- широкополосный спектрометр HR4000CG-UV-NIR;
- волоконно-оптический зонд QR600-7-VIS-125;
- источник питания АКИП-1102.

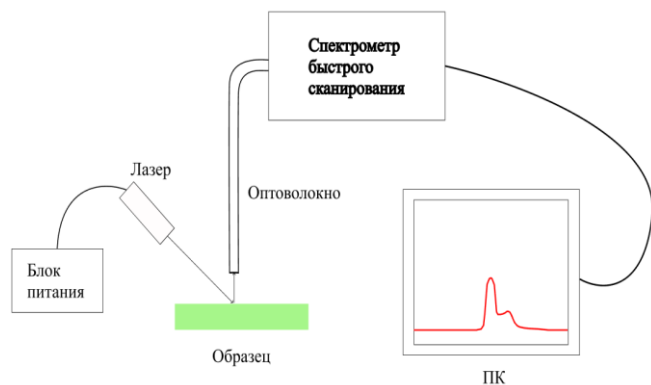


Рис. 1. Установка для измерения флуоресценции

Для измерения спектров флуоресценции растения сначала помещались в темное помещение для адаптации к темноте. Для измерения минимального уровня флуоресценции хлорофилла F_0 лист подсвечивали излучением низкой интенсивности $10 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. По прошествии 10 секунд подавали короткий насыщающий импульс света $0,8 \text{ секунд } 5000 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, обеспечивающий максимальный выход флуоресценции F_m . Через 30 секунд к листу растения применяли свет $100 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ для определения стационарного уровня флуоресценции F_t . Чтобы определить максимальную флуоресценцию в адаптированном к свету состоянии F_m применяли импульс насыщения каждые 10–30 секунд 5 раз, после чего записывали спектр флуоресценции. Сразу после выключения актиничного света измеряли минимальный уровень флуоресценции хлорофилла на свету F_0 [10]. Таким образом, были исследованы по 2 образца каждого вида освещения.

Из спектров, приведенных на рис. 2, видно, что хлорофилл излучает две полосы при 685 и 735 нм, которые являются полосами излучения хлорофилла *a*. В спектре излучения наблюдался основной пик при 685 нм, соответствующий фотосистеме II (ФСII), и широкий спектр от 700 до 750 нм, обусловленный как процессами ФСII, так и ФСI. Фотосистемы II и I – пигментно-белковые комплексы, участвующие в начальных стадиях фотосинтеза [11]. Фотосистемы I типа в качестве терминальных акцепторов используют ферредоксин-подобные белки с железосерным кластером, в то время как фотосистемы II типа переносят электроны на мембранорастворимый переносчик хинон.

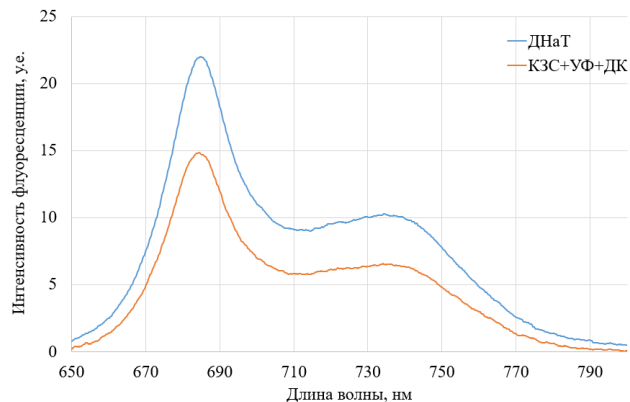


Рис. 2. Спектр флуоресценции хлорофилла в листе *Leonurus cardiaca L.*

По отношению пика на длине волны 685 нм (F_{685}) к пику на длине волны 735 нм (F_{735}) можно косвенно оценить состояние растения и наличие стресса. Таким образом, для растений, произрастающих под воздействием излучения ДНаТ F_{685}/F_{735} равно 2.127, для образцов КЗС+УФ+ИК F_{685}/F_{735} равно 2.205. Это говорит о том, что у образцов ДНаТ больше энергии излучения расходуется на процессы фотосинтеза, и меньше на нефотохимическое тушение. То есть, на ювенильном этапе (20 день) роста и развития *Leonurus cardiaca L.* ДНаТ освещение является более эффективным. Это связано со спектром излучения ДНаТ, где основная часть спектра излучения расположена в красной области. Преимущественное воздействие такого излучения ускоряет фазы роста растения, в связи с чем растение быстро вытягивается вверх и имеет большее количество листьев, по сравнению с другими образцами, однако из-за отсутствия излучения в синей области спектра, корневая система развита хуже, площадь листьев меньше. График поглощения хлорофиллов представлен на рис. 3.

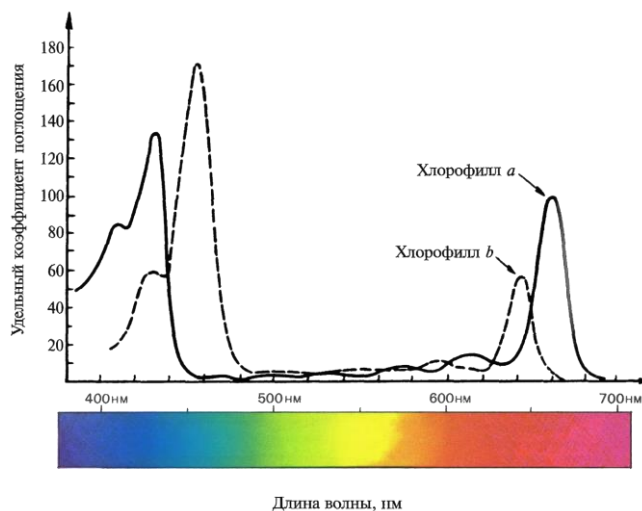


Рис. 3. Спектр поглощения хлорофиллов

Хлорофилл *b* – облигатный компонент фотосинтетического аппарата высших растений и основной регулятор процессов биосинтеза и деградации светособирающих антенных комплексов, поглощает энергию преимущественно в синей области спектра [12]. Малое количество синего света уменьшает размер листьев и биомассу растения.

В спектре излучения ДНаТ почти полностью отсутствует синий свет, который необходим для роста и развития растения. Синий свет отвечает за развитие корневой системы и листьев, красный – за вытягивание растений, цветение, плодоношение. Поэтому образцы ДНаТ имеют длинные стебли и маленькие листья.

При излучении лазера с длиной волны 515 нм отношение пиков F685/F735 для ДНаТ образцов равно 1.76, что является более точной оценкой [13]. Образцы, выращенные под ДНаТ освещением, имеют большую высоту и количество листьев (рис. 5).

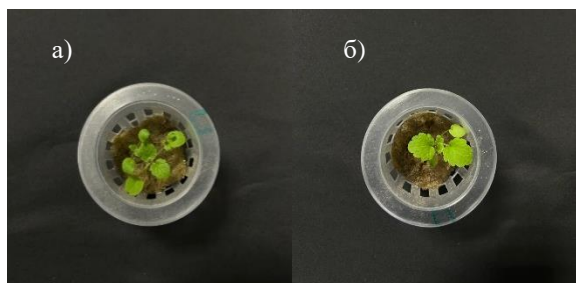


Рис. 4. Внешний вид образцов – а) ДНаТ б) КЗС+УФ+ДК

III. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя вышеизложенное, можно сделать вывод, что на 20 день роста *Leonurus cardiaca* L. наиболее эффективным является излучение ДНаТ. Это связано со спектром излучения, где преобладает красный свет, ускоряющий фазы роста растения. Флуоресцентный анализ позволяет точно определить наличие стресса у растения. Измерение спектров флуоресценции растений с помощью лазера с излучением на длине волны 515 нм дает более точную оценку, чем с помощью лазера с излучением на длине волны 405 нм [14].

Результаты работы показывают, что анализ спектров флуоресценции может точно указывать на наличие стресса растений *Leonurus cardiaca* L. Измерения флуоресценции могут быть полезны для физиологического контроля сельскохозяйственных культур и для выявления стресса растений с точки зрения ингибирования хлорофилла. Флуоресцентная спектроскопия дает возможность получить спектральные характеристики хлорофилла посредством неразрушающего взаимодействия света с листьями растений, что может привести к ранней диагностике заболеваний. Оценка устойчивости к болезням является центральным аспектом фенотипирования растений для повышения урожайности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Pashayeva A., Wu G., Huseynova I., Lee C.-H., Zulfugarov I.S. Role of thylakoid protein phosphorylation in energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence in rice plants // *Int. J. Mol. Sci.* 2021, vol. 22, p. 7978. DOI: 10.3390/ijms22157978.
- [2] Kancheva R., Iliev I., Borisova D., Chankova S., Kapchina V. Detection of Plant Physiological Stress Using Spectral Data // *Ecological Engineering and Environment Protection*, 2005, vol. 1, pp. 4-9.
- [3] Leal J.F.L., Borella J., dos Santos Souza A., Langaro A.C., de Moura Carneiro R., de Souza da Silva G., de Oliveira Junior F.F., de Souza F.R., Lopes Machado A.F., de Pinho C.F. Photosystem II- and photosystem I-inhibitor herbicides-driven changes in the dynamics of photosynthetic energy dissipation of *Conyza* spp. // *Acta Physiol. Plant.* 2023, vol. 45, p. 94. DOI: 10.1007/s11738-023-03572-1.
- [4] Blum A. Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production // *Plant Cell Environ.* 2017, vol. 40, pp. 4–10. DOI: 10.1111/pce.12800.
- [5] Kalaji M.H., Carpentier R., Allakhverdiev S.I., Bosa K. Fluorescence parameters as an early indicator of light stress in barley // *J. Photochem. Photobiol. B* 2012, vol. 112, pp. 1–6. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2012.03.009.
- [6] Ерохин М.М., Камшилов П.В., Терехов В.Г., Туркин А.Н. Исследование характеристик светодиодов для фитооблучателей // «Светотехника». 2019, № 5, с. 42-48.
- [7] Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений: Учебник. М.: Высшая школа, 2006, 742 с.
- [8] Батухтин Н.М., Дегтерев А.Э., Романович М.М., Ламкин И.А. Исследование влияния освещения различного спектрального состава на флуоресценцию хлорофилла в листьях *ocimum basilicum* // XI Научно-практическая конференция с международным участием «Наука настоящего и будущего» для студентов, аспирантов и молодых ученых: Сб. материалов конференции 18-20 мая 2023, т. 2, с. 12-15.
- [9] Degtereva M., Levin Y., Gubina A., Degterev A., Lamkin I., Konoplev G., Tarasov S., Whaley A., Whaley A., Suloev I., Danilova A., Gusev K., Maimistov D. Influence of the Spectral Composition of Illuminating Light Sources on Biometric and Phytochemical Characteristics of *Ocimum basilicum* L. // *Photonics* 2023, vol. 10, p. 1369. DOI: 10.3390/photonics10121369.
- [10] Anderson J.M. Changing concepts about the distribution of photosystems I and II between grana appressed and stroma-exposed thylakoid membranes // *Photosynth. Res.* 2002, vol. 73, pp. 157–164. DOI: 10.1023/A:1020426525648.
- [11] Moustakas M., Guidi L., Calatayud A. Editorial: Chlorophyll fluorescence analysis in biotic and abiotic stress, volume II // *Front. Plant Sci.* 2022, vol. 13, p. 1066865. DOI: 10.3389/fpls.2022.1066865.
- [12] Khozeeva V., Zimina A., Sroslova A. Oxidative stress of plants: chemistry, physiology, methods of protection // *Natural Systems and Resources*. 2020, vol. 10, No. 4, pp. 30-43. DOI: 10.15688/nsr.jvolsu.2020.4.4
- [13] Белов М.Л., Булло О.А., Городничев В.А. Лазерный флуоресцентный метод обнаружения стрессовых состояний растений, вызванных недостаточным уровнем питательных веществ или наличия загрязнителей в почве // *Наука и образование*, 2010, с. 299-318. DOI: 10.7463/1212.0506199
- [14] Iswanti S., Minarni S., Zulkarnain U. Applications of Laser Induced Chlorophyll Fluorescence Imaging to detect Environmental Effect on Spinach Plant // *Proceeding of 5th International Seminar on New Paradigm and Innovation on Natural Science and Its Application (5th ISNPINSA)*, 2015, pp. 104-108.