

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра водных и наземных экосистем

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_

подпись инициалы, фамилия

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Сезонная динамика фотосинтетического аппарата *Larix sibirica* L.

06.04.01 «Биология»

код и наименование направления

06.04.01.02 «Физиология растений»

код и наименование магистерской программы

Руководитель	_____	<u>д.б.н., профессор</u>	<u>Н. А. Гаевский</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Руководитель	_____	<u>д.б.н., профессор</u>	<u>И. Н. Третьякова</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник	_____	<u>ББ16-02М, 041625606</u>	<u>Н. С. Помыткин</u>
	подпись, дата	номер группы, номер зачетки	инициалы, фамилия
Рецензент	_____	<u>к. б. н. доцент</u>	<u>Н. В. Пахарькова</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия

Красноярск 2018

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	5
1.1 Роль фотосинтеза хвойных.....	5
1.2 Физиологические особенности лиственницы сибирской.....	6
1.3 Фенология фотосинтетического аппарата лиственницы.....	15
1.4 Структура фотосинтетического аппарата и флуоресценция хлорофилла .....	16
1.5 Клональное микроразмножение в культуре in vitro.....	20
Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ.....	21
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	24
1.1 Нарушение сезонной фенологии лиственницы сибирской в 2016.....	24
3.2 Сезонная динамика клоновых деревьев лиственницы сибирской... <b>Bookmark not defined.</b>	34
3.3 Динамика деревьев лиственницы в естественных условиях .....	<b>Error!</b> <b>Bookmark not defined.</b> 39
3.4 Сравнение пигментного состава лиственницы сибирской .....	<b>Error!</b> <b>Bookmark not defined.</b> 40
Заключение .....	25
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	26

## ВВЕДЕНИЕ

Лиственница сибирская (*Larix sibirica* L.) является одним из основных лесообразующих видов. Занимает большую площадь, являясь самым распространенным видом из рода *Larix*, в целом этот род составляет около 40 % от всех лесов в России. Так же этот вид активно используется в лесоводстве, так как обладает очень ценной древесиной, которая обладает прочностью и устойчивостью к гниению. Применяется этот вид и в озеленении городов. Не плохо переносит антропогенные нагрузки.

Продуктивность этого вида, как и всех растений в нормальных условиях зависит от эффективности фотосинтетического аппарата. Род лиственница является листопадным видом. Что отличает их от других хвойных, которые являются вечнозелеными.

В последнее время актуальной темой становится изменение климата. Фотосинтез как сам оказывает значительное влияние на климат, так и является хорошим индикатором его изменения. Тем более аномальные погодные явления приходились на исследуемый период.

Так же в связи с тем, что лиственница сибирская в последние годы страдает от антропогенной нагрузки, частых неурожаев, атаки патогенных организмов, в последнее время разрабатываются программы по лесовозобновлению с использованием клонального микроразмножения в культуре *in vitro*. Которые позволяют быстро размножить растения с полезными свойствами, которые могут теряться при обычном скрещивании. Для лиственницы как древесного растения это особенно актуально, учитывая, что данный вид не размножается вегетативно.

Цель работы: изучить сезонную динамику фотосинтетического аппарата лиственницы сибирской.

Задачи:

1. Изучить динамику фотосинтетического аппарата лиственницы сибирской в условиях антропогенной нагрузки, в естественных условиях, и у деревьев, полученных путем микроклонального размножения.

2. Проанализировать причины нарушения листопада у лиственницы сибирской в 2016 году на основе погодных условий, фенологических данных и физиологических исследований.

Исследования проведены в лаборатории физиологии и биохимии растений кафедры водных и наземных экосистем под руководством доктора биологических наук Н. А. Гаевского и на экспериментальной станции «Погорельский бор» Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН под руководством доктора биологических наук И. Н. Третьяковой.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Роль фотосинтеза хвойных

Нет более значимого процесса на Земле, проложившего связи между живой и неживой природой – это фотосинтез зеленых растений. Фотосинтезирующие растительные организмы с участием зеленых пигментов хлорофиллов улавливают неорганическую космическую световую энергию солнечных лучей, усваивая неорганические соединения земного происхождения. Фотосинтез, будучи средообразующим фактором в биосфере, сам находится в прямой зависимости от внешних факторов среды [Смашевский, 2014].

Нормальный рост и развитие лиственницы сибирской, как и остальных растительных организмов, зависит от природных факторов, создавших среду обитания. В первую очередь, к подобным природным факторам, относят такие элементы неживой природы как вода, свет, температура и почва.

Однако несбалансированность природных факторов в результате аномальных погодных условий может привести к замедлению роста и гибели деревьев. Так, процесс фотосинтеза протекает при определенном соотношении солнечного света, воды и углекислого газа. Но при ярком освещении, происходит перегрев поверхности растения и увеличение транспирации. В результате возникающего дефицита воды происходит остановка процесса фотосинтеза и замедление роста. Аналогичным эффектом обладает повышенная температура и низкое количество осадков [Тетерин, 2012].

Состояние фотосинтетического аппарата (ФСА), который играет важнейшую роль в обеспечении биологической продуктивности растений, является хорошим индикатором, характеризует состояние растений в целом. Так же по состоянию ФСА можно проследить скрытые изменения, которые

происходят при переходе растений в состояние зимнего покоя и последующем выходе из этого состояния [Пахарькова и др., 2013].

Умеренные бореальные леса распространены на территории Сибири, Дальнего Востока, Урала, Севера Европы, так же в Канаде и на Аляске. В основном эти леса состоят из вечнозеленых хвойных видов, такие как ель, пихта, сосна и широколиственных видов [Nakai et al, 2008.]. Они покрывают 11% суши и хранят около четверти наземного углерода в биомассе растительности и почвы. Обширные площади, покрытые лесом с высоким содержанием накопленного органического вещества, рассматривают как основные причины воздействия углеродного баланса бореальных лесных экосистем на концентрацию атмосферного CO<sub>2</sub>. Значительная часть бореальных лесов Евразии располагается в зоне вечной мерзлоты, которая будет подвергаться деградации в условиях глобального потепления [Максимов, 2005].

Умеренные бореальные леса требуют особого внимания, так как глобальные углеродные циклы составляют около 50% от всего мирового леса, и предполагается что они являются основными поглотителями углерода. Таким образом, лиственница может иметь большое влияние на поглощение углерода в наземных экосистемах [Wang Hui-min et al. 2008].

## **1.2 Физиологические особенности лиственницы сибирской.**

Лиственница сибирская (*Larix sibirica*) – вид хвойных деревьев из рода Лиственница, семейства Сосновые. Дерево высотой 35-45 м. Древесина лиственницы прочная, обладает ценными механическими свойствами.

Основная особенность – сбрасывание хвои на зиму – выделяет её среди других видов семейства сосновых. Хвоинки мягкие и плоские, собранные в пучки по 20-40 штук. Побеги с такой хвоей являются укороченными и называются брахибластами. Удлиненные побеги называются ауксибластами, хвоя на них расположена одиночно. Основную роль в валовом фотосинтезе

играет хвоя брахибластов, так как хвоя ауксибластов имеют малую долю по массе от общей хвои и расположена на молодых только начинающих развиваться побегах ссылка.

Лиственница сибирская по ряду характеристик схожа с лиственницей Сукачева, но при этом имеет ряд отличий, в основном заключающихся в морфологии и сезонной динамике шишек. Лиственница сибирская обладает большим ареалом, включающим Западную и Восточную Сибирь, Прибайкалье и Забайкалье. На севере она распространяется до северного предела лесов, а на юге - до степей Азии. Может произрастать на самых разных почвах: на сухих песках, суглинках, мелких торфяниках и т. д [Дылис, 1981].

Лиственница является светолюбивым видом. Однако в молодом возрасте до 12-15 лет жизни может выносить значительное затенение и произрастать под пологом древостоев. Благодаря ареалу охватывает территории с очень разнообразными условиями. Может произрастать как в холодном климате лесотундры, так и в жарком сухом климате степей. Однако благоприятными экологическими условиями для лиственницы сибирской являются склоны, около 1000 м над уровнем моря, с равномерно увлажненными, хорошо дренированными, слабо кислыми или нейтральными почвами. В хорошо дренированных почвах лиственница может развить мощную корневую систему, что позволяет лиственнице лучше добывать воду и минеральные вещества, а также придает ветроустойчивость [Суворова, 2008].

Листопадность кроны и холодостойкость корней обеспечивают устойчивость лиственницы к суровым климатическим условиям. Распространение лиственницы к суровым климатическим условиям с сухим климатом может быть обусловлено наличием сезонной и многолетней мерзлоты, постепенное оттаивание которой сохраняет и поддерживает оптимальную влажность почвы. Молодая хвоя брахибластов лиственницы подвержена действию заморозков. Эта порода обладает меньшей

ксерофильностью по сравнению с видами сосен. Как и все хвойные деревья, лиственница выделяет в атмосферу фитонциды, позволяющие обеспечивать естественное очищение воздуха. Способность лиственницы сбрасывать хвою в зимний период позволяет ей избавиться от накопленных за сезон токсичных веществ, что способствует устойчивости растения. В отличие от остальных хвойных пород, лиственница является быстрорастущим деревом. Корневая система хорошо развита, благодаря чему деревья не страдают от ветровала [Пивкина, Сокольская, 2014].

С ростом использования лесов, сеянцы лиственницы могут стать сильно зависимыми от условий окружающей среды. Более того, атмосферная концентрация углекислого газа ежегодно растет из-за интенсивного использования тропических лесов и ископаемого топлива. Продуктивность массы лиственничных лесов является большим стоком углерода. Так же, их нужно учитывать для моделирования и прогнозирования концентрации углекислого газа в атмосфере [Koike et al. 2009].

У лиственницы начало роста хвои брахибластов и одновременное возрастание интенсивности фотосинтеза происходят в середине второй декады мая. [Mudrik, Vil'chek, 2001]. В отличие от покрытосеменных, голосеменные растения обладают уникальным свойством для контролируемого собирания хлорофилл-связывающих белков. [Demko et al. 2009]

Снижение синтеза хлорофилла при недостатке света приводит к тому, что сеянцы остаются бледными на более поздних стадиях. Таким образом, можно считать лиственницу переходным типом между голосеменными и покрытосеменными растениями [Maksimova, Slovakova, 2014].

Лиственница активна только в течение теплых месяцев года и характеризуется обесцвечиванием листьев осенью в конце вегетации. Старение представляет собой сложный процесс, инициирование которого в листьях происходит под действием температуры и фотопериода. Анализ фотосинтетических пигментов (хлорофилла а, b и каротиноидов) позволяет



охарактеризовать последовательность физиологических событий [Rosenthal, Camm, 1997].

Нужно отметить, что динамика покоя лиственницы сибирской свидетельствует о значительно меньшей глубине покоя по сравнению с березой повислой. Покой феллодермы лиственницы в наибольшей степени зависит от текущей температуры воздуха, однако даже в состоянии покоя при низких температурах, интенсивное освещение может вызвать фотоингибирование [Alekseev et al. 2007].

При этом в горно-лесном поясе фотосинтетический аппарат сохраняет признаки, характерные для светолюбивых растений. Содержание пигментов в её хвое возрастает с увеличением возраста её побегов. Динамика фотосинтеза лиственницы в течении дня зависит от погодных условий и достигает в июле наибольших величин при низком дефиците влаги в воздухе. С увеличением дефицита влажности снижается проводимость устьиц, что лимитирует фотосинтез и транспирацию. В экстремальных условиях гор лиственница сибирская имеет невысокие значения скорости фотосинтеза [Загирова, 2014].

Некоторые исследования показывают, что ёмкость фотосинтеза больше зависит от среднегодовой температуры, чем от её резких колебаний. Это объясняется тем, что растения способны к фотосинтезу в том диапазоне температур, который типичен для их среды. Также чувствительность фотосинтетической активности весной у лиственницы выше, чем осенью.

В раннем старении, Са, Сб, и Схсодержащие + сумменьшаются, однако при этом не происходит снижение эффективности фотосинтеза, так как реакционные центры хлоропластов все ещё могут работать [Galvagno et al. 2013].

Однако основным регулирующим фактором для перехода растений от активной вегетации к зимнему покою является измерение длинны светового дня. Но и температурный фактор оказывает значительное влияние, как во

время осенней фотопериодической реакции, так и различные фазы зимнего покоя [Пахарькова, 2016].

Сезонные изменения физического и биохимического состояния растений являются ответом на климатические изменения и потому представляют большой интерес для климатических исследований. Значительные колебания интенсивности фотосинтеза от года к году, а также по сезонам связаны как с воздействием внешних условий в момент измерения фотосинтеза, так и (возможно, даже в большей степени) с перестройкой фотосинтетического аппарата при длительном воздействии внешних условий разной интенсивности [Цельникер и др. 2007].

В отношении лиственницы по сравнению с нелистопадными хвойными, рассмотренные ниже механизмы развиваются в тканях феллодермы, а не в хвое. Фотосинтетический аппарат вечнозеленых хвойных обладает комплексной системой защитных механизмов, которые помогают избегать фотоингибирования в условиях отрицательной температуры.

Одной из важных составляющих этой комплексной системы являются каротиноиды, которые стабилизируют мембраны хлоропластов и белки антенных комплексов, поглощают и рассеивают «неиспользуемую» в этих условиях световую энергию. Максимальное содержание каротиноидов в хвое наблюдается в зимний период, но и весной их количество достаточно велико.

В условиях городской среды у хвойных пород наблюдаются повреждения хвои, снижается продолжительность ее жизни, уменьшается охвоенность кроны, ослабляются и отмирают растения, понижается жизненный потенциал древостоев. Степень депрессии, вызванной антропогенной нагрузкой, зависит от чувствительности вида, продолжительности и интенсивности воздействия стрессовых факторов. Среди хвойных пород более устойчивы в условиях города лиственница сибирская и сосна сибирская. *Pinussylvestris* L. из-за высокой

чувствительности к стрессовым воздействиям может использоваться для фитомониторинга как индикатор [Ковригина, Петуникина, 2011].

Устойчивость фотосинтетического аппарата хвойных к неблагоприятному воздействию факторов среды на структурном уровне определяется соотношением мезофилла и структурных (защитных) тканей в хвое. У исследованных нами хвойных выявлено разное соотношение структурных элементов в хвое, что может определять разную устойчивость их фотосинтетической активности к действию таких экстремальных факторов, как почвенная и атмосферная засуха. Существуют две разные системы регуляции фотосинтетической активности мезофилла, связанные с пигментной системой. При засухе прямая ограничивающая регуляция фотосинтетического поглощения  $\text{CO}_2$  осуществляется через последовательность: водный режим – хлорофилл – фотосинтез. При оптимальных условиях увлажнения регуляция фотосинтеза происходит иначе: температурные условия корневой системы определяют увеличение содержания хлорофилла в мезофилле хвои и повышение эффективности его работы. Наряду со структурными защитными приспособлениями хвои эти два основных регуляторных механизма определяют основу высокого фотосинтетического потенциала хвойных. [Оскорбина и др, 2010]

При переходе от фазы активной вегетации к фазе зимнего покоя клетки фотосинтезирующей паренхимы претерпевают ряд изменений, таких как: изменение количества и соотношения пигментов, увеличение доли ненасыщенных жирных кислот в мембранах, повышение концентрации моно и олигосахаров, синтез криопротекторных белков, увеличение вязкости цитоплазмы, изменение структуры фотосинтетического аппарата.

Среди голосеменных наиболее ранние сроки перехода в состояние покоя, большая глубина покоя и более поздний выход из этого состояния отмечены у сосны обыкновенной. Кроме того, эта кривая наиболее сглажена, т.е. глубина покоя сосны обыкновенной в наименьшей степени зависит от текущей температуры. Для пихты сибирской, наоборот, характерны наиболее

короткие сроки зимнего покоя и наименьшая его глубина, в значительной степени зависящая от температуры воздуха. У ели сибирской и сосны сибирской зарегистрированы промежуточные значения.

Нужно отметить, что динамика вынужденного покоя у лиственницы сибирской свидетельствует о значительно меньшей глубине покоя по сравнению с березой повислой. Покой феллодермы лиственницы в наибольшей степени зависит от текущей температуры воздуха

Так же, как и в естественных условиях, наибольшую глубину покоя демонстрирует *Pinus sylvestris*, чья хвоя начинает вегетировать на четвертые сутки, а средние значения отмечены для *Pinus sibirica* и *Picea obovata*, которые выходят из состояния покоя через двое суток.

Температура по-разному оказывает влияние на растения. Если одни растения получают необратимые повреждения при 10° С, то другие способные выдерживать сверхнизкие температуры, вплоть до -253° С. Так же помимо того, что растения обладают и разными оптимумами для фотосинтеза, так и оптимумы для одного растения зависят от разных факторов (сезона влажности и т. д.).

На фотосинтез влияют как температуры в данный момент, так и предшествующие температуры за сезон. Так фотосинтез хвойных, в том числе и лиственницы зависят от температуры почвы в весенний период. Так же у лиственницы сезонную динамику помимо температуры координирует продолжительность дня. Так в почве, в которой температура поддерживалась на 3 °С выше нормы, удалось отсрочить снижение хлорофилла на 10 дней. А продление фотопериода в 16 часов отсрочило потерю хлорофилла на 32 дня [Rosenthal, Camm, 1997] .

Сибирь характерна резко-континентальным климатом, что означает резкие перепады температур. Поэтому растениям нужно уметь переносить перепады температур. Несмотря на то, что растения могут переносить экстремально низкие температуры и тем самым переживать самые холодные

зимы, они легко могут стать жертвой заморозка, так как для противостояния низким отрицательным температурам растениям нужно закаливание.

В период вегетации побеги могут погибнуть при температуре около  $-5^{\circ}\text{C}$ . Однако при постепенном снижении температуры понижается и та температура, которую растения могут выдержать, самый низкий температурный порог наблюдается в самые сильные морозы. Например, в естественных условиях ель могла выдержать  $-50^{\circ}\text{C}$ , а береза  $-65^{\circ}\text{C}$ .

Для того, чтобы растениям подготовиться к сильным морозам, им необходимо пройти 3 стадии закаливания. Перед закаливанием растения должны погрузиться в состояние покоя. Один только переход в состояние покоя усиливает зимостойкость древесных растений. Когда растения входят в состояние покоя, создаются условия для застудневания протопласта.

В первой стадии закаливания, которая начинается осенью при положительных температурах, растение накапливает аминокислоты, сахара и другие криопротекторы, что повышает способность цитоплазмы удерживать воду. В результате первой фазы закаливания растения способны выдерживать отрицательные температуры до  $-12^{\circ}\text{C}$ . Объем хлоропластов при этом увеличивается в три раза, что связано с накоплением ими различных веществ. По мере понижения температуры, происходит большее накопление растворенных веществ в клетке. Это понижает температуру замерзания воды, что защищает клетки от образования в них льда. В целом первая фаза закаливания требует значительного времени для накопления защитных веществ и образования студня.

Вторая стадия закаливания происходит уже после листопада, при отрицательных температурах до  $-5^{\circ}\text{C}$ . В этот период происходит образование льда в межклетниках. Образование геля защищает от образования льда внутри клетки, так как образование льда там смертельно. Образовавшийся в межклетниках лед вытягивает из клеток воду. При дальнейшем снижении температуры, воды все больше отходит в межклетники, что значительно понижает точку замерзания внутри клеток.

При обеих стадиях закаливания проницаемость мембран для воды усиливается [Туманов, 1967].

В третьей стадии закаливания происходит дальнейшая физиолого-биохимическая перестройка. Протекает данная стадия при температуре  $-10-15^{\circ}\text{C}$ . Крахмал переходит в сахара и липиды. В целом продолжаются процессы, проходящие во второй фазе. В результате этого, некоторые растения способны выносить до  $-195^{\circ}\text{C}$ . Получается, что растения могут выдержать морозы более сильные, чем можно встретить в природе.

Оптимальные температуры для фотосинтеза растений из регионов с прохладным климатом обычно находятся в диапазоне  $10-30^{\circ}\text{C}$ , в зависимости от экотипа, вида и других особенностей. Растения, которые приспособлены к низким температурам, обычно уязвимы к высоким температурам.

Несмотря на то, что различные виды адаптированы к своей среде обитания, им приходится переносить сезонные и суточные колебания температуры. Особенно значительны эти колебания в умеренных, арктических и альпийских регионах. Время, требуемое для акклиматизации растения к измененной температуре так же различно. Для некоторых растений это может занять около суток. Однако, для большинства растений это занимает от нескольких дней до нескольких недель.

Большой интерес вызывает изучение морозостойкости у хвойных видов, так как они способны сохранять хвоинки в течении нескольких лет, что означает, что их фотосинтетический аппарат способен переносить значительные морозы. Однако, лиственницы является листопадным деревом. Поэтому эти показатели более уместно сравнивать с другими листопадными деревьями. Тем более конкретно лиственнице посвящено мало исследований.

Ингибирование фотосинтеза низкими температурами происходит так же, когда корень растения охлаждается до  $0^{\circ}\text{C}$ . В данном случае, остановка фотосинтеза связана с закрытием устьиц, так как корень поглощает меньше воды.

Непосредственно скорость фотохимических реакций не зависит от изменений температуры, если не происходят структурные изменения в клетке, для адаптации к изменению температуры. Однако, способны оказать влияние на ферменты, участвующие в электрон транспортной цепи. Замораживание останавливает все реакции, связанные с ферментами, этим самым блокируя фотосинтез, хотя некоторые реакции могут происходить при температуре ниже 0 °С.

Получается, что температурный оптимум для фотосинтеза зависит от изменений каталитической активности ферментов, участвующих в фотосинтезе [Öquist, 1983].

### **1.3 Фенология фотосинтетического аппарата лиственницы**

Изменение климата вызывает фенологические сдвиги как весной, так и осенью. Это в свою очередь может значительно повлиять на круговорот веществ и биотические взаимодействия. Задержка осенней фаз старения может привести к затянувшемуся вегетационному периоду, что увеличивает риск замораживания растений в вегетирующем состоянии. Это предотвращает отток питательных веществ из листьев. Изменения в окраске листьев могут оказать влияние на поведение животных, например, на миграцию птиц.

Однако, многие механизмы реакции фенологии на изменение окружающей среды остаются неизученными. В числе факторов влияющих на фенологию растений входят, продолжительность дня, высокие и низкие температуры, засуха, влажность, питательные вещества и патогены. Но большинство исследований рассматривают в основном температуру и длину дня.

Весенние осадки вызывают более раннюю окраску листьев. Однако, осенние ливни, наоборот, задерживают начало пожелтения листьев. Сухая погода летом так же способна вызвать задержку осенней окраски листвы. Так

же высокие минимальные температуры осенью так же способны вызвать задержку старения листьев. Но несмотря на то, что дожди задерживают старение листьев, сильные ливни могут привести к более раннему падению листьев. А сухая погода осенью задерживает падение листьев у большинства видов [Yingying et al. 2018].

Получается, что различные виды реагируют на погодные явления такие как, засуха, ливень, высокие температуры в течении всего вегетационного периода, что впоследствии сказывается на весеннее старение листьев.

### 1.4 Структура фотосинтетического аппарата и флуоресценция хлорофилла

Состояние фотосинтетического аппарата растений традиционно исследуется с помощью флуоресцентных методов. Структура электронно транспортной цепи фотосинтеза показана на рисунке 1.

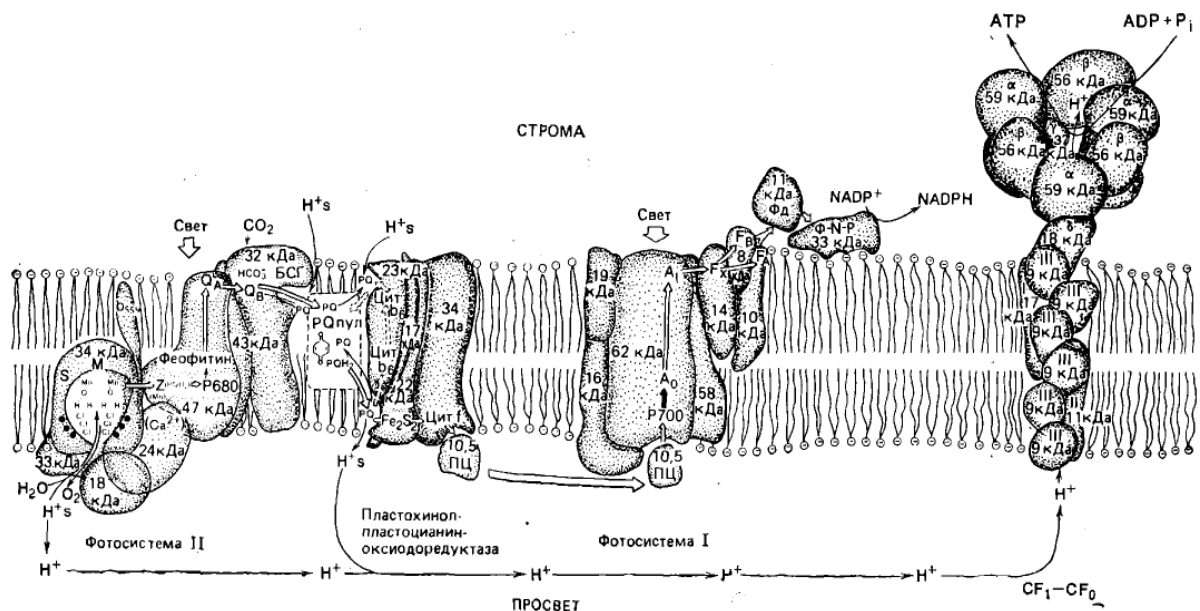


Рисунок 1 - Структура электрон-транспортной цепи фотосинтеза (Говинджи, 1987)

Реакционный центр фотосистемы 1 состоит из двух полипептидов. Первичный донор электронов фотосистемы 1 обозначается как P700, так как поглощает ФАР в районе 700 нм. Первичный донор фотосистемы 2 обозначают как P680 (по аналогии с первой).



После поглощения фотона энергия передается фотосистеме 1, где возбуждается P700 и передает электрон акцептору. Затем электрон передается FE-S центру. Ферредоксин переносит электроны от фотосистемы 1 к NADP<sup>+</sup>, образуя тем самым NADPH, который участвует в фиксации CO<sub>2</sub>.

В фотосистеме 2 очень важен комплекс расщепления воды, который расположен на внутренней стороне мембраны тилакоида. В результате фоторазложения воды освобождаются 4 электрона, которые восстанавливают первичный акцептор фотосистемы 2 с помощью ее реакционного центра. Протоны остаются внутри тилакоида, чем создают протонный градиент, энергия которого расходуется на синтез АТФ. Первичный акцептор посредством вторичного акцептора фотосистемы 2 передает электрон пластохинону.

Далее электрон передается комплексу цитохромов, в котором так же имеется протонный насос, перекачивающий протоны внутрь тилакоида. Затем электрон передается фотосистеме 1.

Как было сказано, продуктивность растений напрямую связана с деятельностью фотосинтетического аппарата. Поэтому по его состоянию можно судить о состоянии всего растения. Одним из способов оценки фотосинтетического аппарата является использование переменной флуоресценции хлорофилла. Сейчас этот метод используется во всех отраслях, связанных с растениями: сельском хозяйстве, лесоводстве, экологии, условиях *in vitro* и т. д. Так же этот метод очень надежен, так как не нарушает жизнедеятельность организма и дает информацию о множестве процессов [Гольцев В. Н. и др. 2016].

Энергия солнечного света может передаваться хлорофиллу светособирающего комплекса. От него энергия передается в реакционные центры представленными фотосистемой 2 (ФС 2) и фотосистемой 1 (ФС 1). Большая часть поглощенной энергии используется на реакции фотосинтеза. Однако, часть энергии теряется в виде тепла и флуоресценции.

Флуоресценция хлорофилла является излучением света, который был поглощен хлорофиллом и составляет 3-5% от поглощенной энергии. В нормальном состоянии фотосинтетического аппарата уровень флуоресценции низкий, но при его нарушении уровень флуоресценции возрастает.

Флуоресценция хлорофилла обычно происходит в красной области спектра, при этом пик флуоресценции хлорофилла *a* расположен в более длинноволновой области, чем пик поглощения хлорофилла. При этом флуоресценция испускается только хлорофиллом *a*, который в основном находится в фотосистеме 2.

Реакционные центры фотосистемы 2 могут находиться в двух состояниях – открытом и закрытом. Центр считается открытым, если его возбуждение может привести к фотохимической реакции. При этом флуоресценция имеет минимальные значения. Флуоресценция, испускаемая при закрытых реакционных центрах, примерно в 5 раз выше, чем при открытых.

Каутским и Хиршем была показана связь активности фотосинтеза и флуоресценции. И то, что это соотношение можно использовать в оценке эффективности фотосинтетического аппарата.

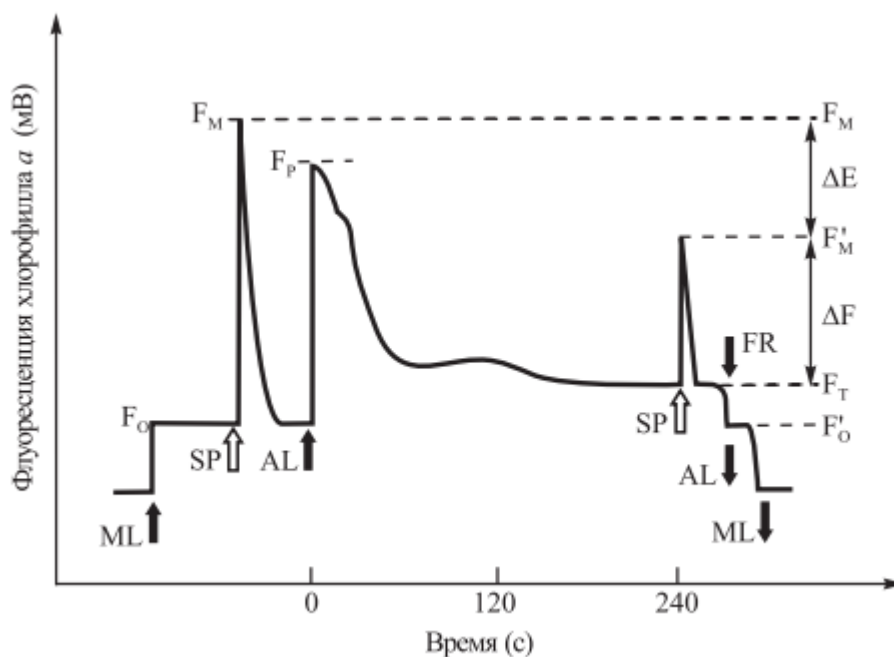


Рисунок 2. Определение фотосинтетической эффективности при измерении модулированной флуоресценции [Гольцев, 2014].

Для оценки состояния фотосинтетического аппарата в настоящее время используется система РАМ (*Pulse Amplitude Modulation*). В качестве источника используется модулированный свет. Прибор регистрирует только модулированный свет. Это означает, что флуоресценцию хлорофилла можно измерять в присутствии других источников света. Измерение начинается с включения очень слабого света, который вызывает флуоресценцию хлорофилла, однако, не способен вызвать значительных фотохимических реакций. Такой свет называется измерительным. Затем включается «вспышка», SP (*Saturating Pulse*) которая представляет собой короткий импульс насыщающего света мощностью до  $16000 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ . В результате её все реакционные центры переходят в «закрытое» положение и уровень флуоресценции резко повышается, достигая максимального значения  $F_M$ . После снижения флуоресценции до прежнего уровня  $F_0$ , включается актиничный свет AL (*Actinic Light*), мощностью  $200\text{-}500 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ . После этого происходит увеличение выхода флуоресценции, которая затем постепенно снижается. После этого включается еще одна насыщающая вспышка, флуоресценция повышается до

уровня  $F_M$ , но этот уровень ниже, чем  $F_M$ , разница заключается в нефотохимическом тушении флуоресценции [Гольцев В. Н. и др. 2016].

### **1.5 Клональное микроразмножение в культуре *in vitro*.**

Лиственница сибирская (*Larix sibirica*) обладает большой пластичностью вегетативных и генеративных органов. Благодаря этому лиственница является самым распространенным древесным видом на территории России. Однако данный вид характеризуется слабыми урожаями и даже полным их отсутствием в неурожайные годы, кроме того лиственница сибирская страдает от поражения лиственничной почковой галлицей.

Для решения этих проблем разрабатываются программы лесовосстановления, в которых предполагается использование инновационной биотехнологии клонального микроразмножения с помощью соматического эмбриогенеза. Клональное микроразмножение путем соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro* является перспективным методом в биотехнологии. С помощью соматического эмбриогенеза можно массово получать растения, идентичные материнским по генотипу. Также из-за быстроты воспроизводства можно быстрее получать генетически улучшенный материал. Это особенно актуально для хвойных видов, которые не размножаются вегетативно. Что позволяет сохранить ценные хозяйственные признаки у растений.

Сегодня соматический эмбриогенез используется для получения и распространения генетически ценных деревьев, и для повышения продуктивности лесов. Однако, для большинства видов биотехнология не разработана. В отличие от цветковых растений, эмбриогенез хвойных видов является многоступенчатым процессом и имеет несколько стадий: индукция, пролиферация, созревание соматических зародышей, прорастание, получение растений - регенерантов и акклиматизацию соматических сеянцев.

## Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Использовали разновозрастные деревья *Larix sibirica* Ledeb. Деревья 30-35 летнего возраста произрастали в слабозагрязненном Октябрьском районе г. Красноярска в непосредственной близости (0,5 км) и на некотором удалении (3,3 км) от главного корпуса Сибирского федерального университета. Более молодые деревья (10-15 лет) произрастали в естественных условиях в 6 км от села Шалинское (Манский район, Красноярский край). Наиболее молодые деревья (4-5 лет) находились на территории экспериментальной базы «Погорельский бор» Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (г. Красноярск). Первые 3-4 года растения находились в необогреваемой теплице, которая была ликвидирована весной 2017 г. Деревья были получены из соматических зародышей дерева донора № 4А в дендрарии Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН. Зародыши находились на стадии глобулы и развития семядолей. Инициацию эмбриогенного каллуса проводили с использованием минеральных базовых сред АИ (патент №2010114891) с добавлением мезоинозита - 1 г/л, ауксина (2,4Д) - 2 мг/л, цитокинина (6-БАП) - 1 мг/мл, сахарозы - 30 г/л, агар-агара - 7 г/л, рН среды приводили к 5,8. Среды автоклавировали при 121 °С, 110 кРа в течении 20 минут. В каждой чашке Петри культивировали 5-7 зародышей на 20 мл индукционной среды в темноте при 25±1 °С.

Созревание соматических зародышей лиственницы проводилось на базовой питательной среде АИ, которая содержала сахарозу (40 г/л), абсцизовую кислоту (АБК) (32 мг/л), индолилмасляную кислоту (ИМК) (0,2 мг/л) и полиэтиленгликоль (ПЭГ 8000) (10%). В качестве желирующего агента использовали Gelrite (4 г/л). Культивирование осуществляли в темноте при температуре 24±1°С. После автоклавирования, в охлажденную питательную среду добавляли регуляторы роста (ИМК и АБК). L-глутамин (500 мг/л) и аскорбиновую кислоту (400 мг/л) [Пак и др, 2016; Третьякова и др, 2015].

Проращение зрелых зародышей проводится на базовой среде, не имеющей растительных регуляторов роста, с пониженным содержанием сахарозы. Удлинение эпикотилия и появление хвои происходит в течении 12-16 недель. Затем проростки переносятся в почву и помещаются в теплицу для акклиматизации. Ко времени исследования лиственницы № 1-9 достигли 5-ти летнего возраста, а лиственницы 10-13 - 4-х летнего.

Факты нарушения нормального хода листопада у *Larix sibirica* были установлены во второй декаде ноября 2016 года на основе собственных наблюдений в городах Красноярск ( $56^{\circ} 02'$  с.ш.  $92^{\circ} 43'$  в.д., Alt. 276 м) и Абакан (республика Хакасия) ( $53^{\circ} 44'$  с.ш.  $91^{\circ} 28'$  в.д., Alt. 243 м), а также сообщений СМИ в городах Новосибирск ( $55^{\circ} 02'$  с.ш.  $82^{\circ} 56'$  в.д., Alt. 150 м) и Барнаул (республика Алтай) ( $53^{\circ} 21'$  с.ш.  $83^{\circ} 40'$  в.д., Alt. 185 м). Нормальный листопад у лиственницы наблюдали в селе Шалинское ( $55^{\circ} 43'$  с.ш.  $93^{\circ} 44'$  в.д., Alt. 399 м).

Среднесуточные и минимальные температуры воздуха в сентябре-октябре в 2015, 2016 и 2017 году в указанных местах произрастания *Larix sibirica* были определены на основе данных взяты с сайта погоды [<https://rp5.ru/Погода в мире>]. Увлажнение территории рассчитывали по гидротермическому коэффициенту Селянинова [Российский гидрометеорологический энциклопедический словарь, 2009]. Исходные данные получены с сайта «Погода в мире». Фенологические данные о хвоепаде у *Larix sibirica* в 2015 и 2016 годах были предоставлены Государственным природным заповедником «Столбы».

Для анализа фотосинтетических пигментов использовали брахибласты с побегов 2 года. Содержание хлорофиллов *a* и *b*, суммы каротиноидов в сырой биомассе хвои, определяли на спектрофотометре (Spekol 1300, AnalyticJena, Германия). Свежесобранную хвою 40–60 мг растирали в 6-ти мл 96 % этилового спирта с добавлением измельченного стекла и мела, затем фильтровали через стеклянный фильтр Шотта. Концентрацию пигментов в экстракте рассчитывали по уравнениям согласно [Lichtenthaler, 1987].

Содержание пигментов выражали в  $\text{мкг} \times \text{г}^{-1}$  (сырой массы). Остаточное содержание хлорофилла *a* в не опавшей хвое в 2016 году выражали в процентах. За 100% принимали изменение содержания пигмента между временем активной вегетации (август) и временем окончания хвоепада у каждого отдельного дерева.

Функциональное состояние фотосинтетического аппарата у хвои оценивали по показателям быстрой флуоресценции хлорофилла. Флуоресценцию регистрировали с помощью прибора JuniorPAM (Walz, Германия).

## Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

### 1.1 Нарушение сезонной фенологии лиственницы сибирской в 2016

Нарушение нормального хвоепада у лиственницы в городах Сибири обратило на себя внимание в ноябре 2016 года. Состояние лиственниц в этот период показано на рисунке 3.



Рисунок 3 - Состояние хвои лиственницы сибирской в ноябре 2016 года (г. Красноярск, фото автора).

Образцы хвои были собраны 19 ноября 2016 года в городе Красноярске. Содержание хлорофилла *a* у деревьев с разных мест произрастания варьировало  $1049 \text{ мкг} \times \text{г}^{-1}$  до  $171 \text{ мкг} \times \text{г}^{-1}$ . Среднее содержание хлорофилла *a* в хвое лиственницы составило  $620 \pm 205 \text{ мкг} \times \text{г}^{-1}$  (рис. 4).



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов можно сделать следующие выводы:

1. Основным фактором, оказывающим влияние на динамику фотосинтетического аппарата, является температура. Фотосинтетический аппарат лиственницы, как и других листопадных деревьев, оказался уязвим к резким падениям температуры.

2. Значительные изменения в динамике фотосинтетического аппарата способны вызвать средние температуры в период вегетации. Средние температуры вызвали фенологический сдвиг, из-за которого лиственница сибирская не успела подготовиться к наступлению холодов.

3. Клоновые деревья лиственницы несмотря на генетическое сходство, имеют различия в росте и пигментном составе на разных периодах вегетации. Различия в содержании пигментов присутствует на всех периодах вегетации: во время роста хвои весной, пиковых значения содержания хлорофилла летом, при осеннем старении.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Архив погоды в опытном поле [Электронный ресурс] // rp5.ru/расписание погоды: [сайт]. URL: [https://rp5.ru/%D0%90%D1%80%D1%85%D0%B8%D0%B2\\_%D0%BF%D0%BE%D0%B3%D0%BE%D0%B4%D1%8B\\_%D0%B2\\_%D0%9E%D0%BF%D1%8B%D1%82%D0%BD%D0%BE%D0%BC\\_%D0%9F%D0%BE%D0%BB%D0%B5](https://rp5.ru/%D0%90%D1%80%D1%85%D0%B8%D0%B2_%D0%BF%D0%BE%D0%B3%D0%BE%D0%B4%D1%8B_%D0%B2_%D0%9E%D0%BF%D1%8B%D1%82%D0%BD%D0%BE%D0%BC_%D0%9F%D0%BE%D0%BB%D0%B5)
2. Барнаульские ботаники рассказали, почему листья на деревьях до сих пор зеленые и не опали [Электронный ресурс] // Алтайпресс – новости Барнаула и Алтайского края: [сайт]. URL: <http://altapress.ru/story/barnaulskie-botaniki-rasskazali-pochemu-listya-do-sih-por-zelenie-i-ne-opali-189438>
3. Орт Д., Говинджи, Уитмарш Дж. и др. Фотосинтез. Т. 1. Пер. с англ. — М.: Мир, 1987. — 728 с.
4. Гольцев В. Н., Каладжи М. Х., Кузманова М. А., Аллахвердиев С. И. Переменная и замедленная флуоресценция хлорофилла а теоретические основы и практическое приложение в исследовании растений. М. Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2014 220 с.
5. Гольцев В. Н. и др. Использование переменной флуоресценции хлорофилла для оценки физиологического состояния фотосинтетического аппарата растений // Физиология растений. – 2016. - № 5. – с. 881-907.
6. Дылис Н. В. Лиственница М.: Лесная промышленность, 1981. — 96 с.
7. Загирова С. В. Структура, содержание пигментов и фотосинтез хвои лиственницы сибирской на северном и приполярном Урале // Лесоведение . – 2014.- № 3. – С. 3-10

8. Ковригина Л. Н., Петуникина Л. О. Хвойные породы в городской среде // Вестник ИРГХСА. – 2011. - № 44. – с. 73-80
9. Летопись природы, книга 74, 2016.
10. Максимов Т. Х., Максимов А. П., Кононов А. В., Сугимото А., Долман А. Й., Мурс Э. Й., М. К. ванн дер Молен., Иванов Б. И. Эколого-физиологические особенности фотосинтеза лиственницы Каяндера в криолитозоне // Лесоведение. – 2005.- № 6. – с. 3-10
11. Оскорбина М. В., Суворова Г. Г., Копытова Л. Д., Осколков В. А., Янькова Л. С. Влияние климатических условий на динамику зеленых пигментов и фотосинтетическую продуктивность хвойных // Вестник КрасГАУ.- 2010. - № 4. – с. 25-30
12. Основные погодно-климатические особенности на северном полушарии земли в октябре 2016 года [Электронный ресурс] // Гидрометцентр России [сайт]. URL: [https://meteoinfo.ru/?option=com\\_content&view=article&id=13463](https://meteoinfo.ru/?option=com_content&view=article&id=13463)
13. Пак М. Э., Иваницкая А. С., Двойнина Л. М., Третьякова И. Н. Эмбриогенный потенциал длительно пролиферирующих клеточных линий *Larix sibirica* in vitro // Сибирский лесной журнал. 2016. № 1. С. 27–38.
14. Пахарькова Н. В., Гетте И. Г., Андреева Е. Б., Сорокина Г. А. Особенности перехода в состояние зимнего покоя голосеменных и покрытосеменных древесных растений // Вестник КрасГАУ. – 2013. - № 6. – с. 121-126.
15. Пахарькова Н. В., Михальчук Я. П., Андреева Е. Б. Влияние температурного фактора на зимний покой хвойных на территории заповедника «Столбы» // Вестник КрасГАУ. – 2016. - № 6. – с. 9-13
16. Пивкина Г. Ю., Сокольская О. Б. Перспективы представителей рода *Larix* в озеленении населённых пунктов // Вестник ландшафтной архитектуры. – 2014. - № 4 .- с. 106-109

17. Российский гидрометеорологический энциклопедический словарь / Под ред. А. И. Бердицкого. – СПб.; Москва: Летний сад, 2009. – Т 1. – 336 с.
18. Смашевский Д. С. Экология фотосинтеза // Астраханский вестник экологического образования. – 2014. - №2. – с. 165-180.
19. Тетерин А. А. Явление аномальных погодных явлений на рост и развитие лиственницы сибирской // Аграрный вестник Урала. - 2012. - № 11.
20. Туманов И. И., Красавцев О. А., Закаливание северных древесных растений отрицательными температурами // Физиология растений. – 1959. с. 654-667.
21. Цельникер Ю. Л., Корзухин, М. Д., Суворова Г. Г., Янькова Л. С., Копытова Л. Д., Филиппова А. К. Анализ влияния факторов среды на фотосинтез хвойных Предбайкалья // Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем. – 2007. - № 21. – 265-292.
22. Alekseev A. A., Matorin D. N., Osipov V. A., Venediktov P. S. Investigation of the Photosynthetic Activity of Bark Phelloderm of Arboreus Plants Using Fluorescent Method // Moscow University Biological Sciences Bulletin – 2007. № 4 .- P. 28-33.
23. Demko V., Pavlovic. A., Valkova D., Skovakova L., Grimm B., Hudak J. A novel insight into regulation of light-independent chlorophyll biosynthesis in *Larix deciduas* and *Picea adies* seedlings // *Planta*. – 2009. – P. 165-176
24. Galvagno M. et all Seasonal course of photosynthetic efficiency in *Larix deciduas* Mill. in response to temperature and change in pigment composition during senescence // *Biometeorol.* – 2013. P. 871-880.
25. Lichtenthaler, H. K. Chlorophylls and Carotenoids, the Pigments of Photosynthetic Biomembranes // *Methods Enzymology* / eds. R. Douce, L. Packer. – N. Y. :Academic, 1987. – P. 350–382.

26. Nakai Y., Matsuura Y., Kajimoto T., Abaimov A. P., Yamamoto S., Zyryanova O. A. Eddy covariance CO<sub>2</sub> flux above a Gmelin larch forest on continuous permafrost in Central Siberia during a growing season // *Theoretical and Applied Climatology*. – 2008. – P. 133-147.
27. Maksimova N. Slovakova L. Accumulation pigments in *Larix deciduas* Mill. And *Picea abies* (L.) Karst. Cotyledons treated with 5-aminolevulinic and under different irradiation // *Photosynthetica*. – 2014. - № 4. – P. 203-210
28. Mudrik V. A., Vil'chek G. E. Ecophysiological Responses of *Larix sibirica* Ledeb. And *Pinus sibirica* Du Tour Undergrown to Climate Change // *Russian Journal of Ecology*. – 2001. - № 4. – P. 267-273
29. Öquist G. Effects of low temperature on photosynthesis // *Plant, Cell and Environment*. – 1983. p. 281-300
30. Selma I. Rosenthal and Edith L. Camm Photosynthetic decline and pigment loss during autumn foliar senescence in western larch (*Larix occidentalis*) // *Tree Physiology* 1997, 17, P. 767– 775.
31. Voronin P. Yu., Fedoseeva G. P. Stomatal Control of Photosynthesis in Detached Leaves of Woody and Herbaceous Plants // *Russian Journal of Physiology*. – 2012. - №2. – P. 309-315.
32. Yingying X. et al. Predicting autumn phenology: How deciduous tree species respond to weather stressors // *Agricultural and Forest Meteorology* 250-251, P. 127-137.
33. Wang Hui-min, Saigusa Nobuko, Zu Yuan-gang, Yamamoto Susumu, Kondo Hiroaki. Carbon Fluxes and their response to environmental variables in Dahurian larch forest ecosystem in northeast China // *Journal of Forestry Research*. – 2008. – P. 1-10



Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра водных и наземных экосистем

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 М. И. Гладышев

подпись инициалы, фамилия

« 15 » июль 20 18 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Сезонная динамика показателей фотосинтетического аппарата  
*Larix sibirica* L.

06.04.01 «Биология»

код и наименование направления

06.04.01.02 «Физиология растений»

код и наименование магистерской программы

Научный руководитель

  
подпись, дата

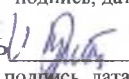
профессор д.б.н.,

должность, ученая степень

Н. А. Гаевский

инициалы, фамилия

Научный руководитель

  
подпись, дата

профессор д.б.н.

должность, ученая степень

И. Н. Третьякова

инициалы, фамилия

Выпускник

  
подпись, дата

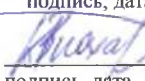
ББ16-02М, 041625606

номер группы, номер зачетки

Н. С. Помыткин

инициалы, фамилия

Рецензент

  
подпись, дата

к. б. н. доцент

должность, ученая степень

Н. В. Пахарькова

инициалы, фамилия

Красноярск 2018