

А.П. Юрков, Д.Г. Семенов

**НЕИНВАЗИВНОЕ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ
ЭФФЕКТИВНОСТИ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ
ЛЮЦЕРНЫ ХМЕЛЕВИДНОЙ**

A.P. Yurkov, D.G. Semenov

**NONINVASIVE SPECTRAL PHOTOMETRIC ANALYSIS
OF THE PHOTOSYNTHETIC EFFICIENCY
OF ARBUSCULAR MYCORRHIZA IN BLACK MEDIC**

*Настоящее исследование было направлено на создание и апробацию оптико-механической установки неинвазивного спектрометрического анализа отражения света листьями растений. С помощью установки проведено исследование фотосинтетической эффективности симбиоза люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina*) со штаммом эндомикоризного гриба *Glomus intraradices*. Определены спектральные диапазоны, наиболее чувствительные к микоризации: 709–715 нм и 527–574 нм. В этих диапазонах листья микоризованных растений имели более низкое отражение (а значит, сильнее поглощали свет) в сравнении с листьями контрольных растений. Проведено сравнение динамики светоотражения в указанных спектральных областях развивающихся микоризированных и контрольных растений, выращенных на почве с низким и оптимальным содержанием фосфора. Установлены определенные преимущества неинвазивного спектрометрического подхода к оценке активности фотосинтеза перед биохимическими методами.*

*The research is aimed at developing and testing the optic mechanical set for non-invasive spectral analysis of leaf reflectance. The set was used in order to explore photosynthetic efficiency of symbiosis between black medic (*Medicago lupulina*) and strain of endomycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*). The spectral bands which are most sensitive to micorrhization have been identified: 709–715 nm and 527–574 nm. In these spectral bands the leaves of mycorrhizal plants demonstrate a lower level of reflectance (therefore a high level of absorbance), as compared to the control. We have compared the light reflectance dynamics in ontogenesis of mycorrhizal and control plants, both growing with low and normal phosphorus levels in soil. The noninvasive spectrometrical approach under study has showed certain advantages in evaluation of photosynthetic activity compared to biochemical techniques.*

Введение

Самым распространенным растительно-микробным симбиозом на Земле является арбускулярная микориза (АМ). Ее образуют большинство наземных растений с эндомикоризными грибами типа *Glomeromycota*. АМ оказывает общестимулирующее влияние на растения, усиливая их питание, особенно фосфорное, и защищая от корневых патогенов. Микосимбионт получает от растения глюкозу в качестве легкодоступного энергоемкого субстрата и другие орга-

нические молекулы, синтезируемые клетками растения-хозяина (Vago, 2000). Молодое растение, очевидно, не может являться полноценным партнером в симбиозе до тех пор, пока его листья не создадут достаточно развитую избыточно активную систему фотосинтетической продукции С-соединений (Pfeffer, 1999; Estrada-Luna, 2000). Вместе с тем показано, что инфицирование растения гифами и арбускулами микосимбионта происходит уже на самых ранних стадиях онтогенеза растений (Duc, 1989; Smith, 1997). Очевидно, в формировании симбиоза иницирующая роль принадлежит именно грибу. Возросший в результате микоризации приток фосфора «авансирует» ускоренное формирование всех внутриклеточных и тканевых систем хозяина через стимуляцию энергообмена. Несмотря на актуальность исследования столь распространенного и полифункционального вида симбиоза, до сих пор не ясна динамика показателей фотосинтетической эффективности микоризы в ходе онтогенетического развития фитосимбионта. Поскольку обычные биохимические методы позволяют судить о тотальном содержании хлорофиллов и каротиноидов в вытяжках из гомогенатов листьев растения, остается не ясным, какая их часть относится к пулу пигментов действительно фотоактивных на данной фазе развития. Кроме того, биохимические данные не могут быть в полной мере приложимы к интактному растению *in vivo*, во всяком случае, в отношении спектральных характеристик выделенных пигментов. Одним из перспективных методологических подходов, позволяющих решить эти проблемы, является спектрометрия светопоглощения листьями интактных растений на различных этапах его развития.

Целью исследования являлась разработка методики неинвазивной спектрометрической оценки поглощения света листьями люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina* L.) и ее испытания в условиях развития симбиоза с эндомикоризным грибом (*Glomus intraradices*).

Материалы и методы

Объект исследования

В качестве модельного растения-хозяина была выбрана линия S9m2 сортопопуляции ВИК32 люцерны хмелевидной, которая характеризуется ранним откликом на микоризацию (8-12-е сутки от посадки). В качестве микосимбионта из нескольких штаммов вида *Glomus intraradices* был выбран высокоэффективный штамм CIAM8, селективированный во ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии. Инокуляция и вегетационные эксперименты проведены в стерильных условиях для избежания заражения иными ризосферными микросимбионтами по методике Л.М. Якоби с соавторами (Jacobi, 2003). Поскольку основную экологическую функцию микоризы связывают с усилением фосфорного питания растений, необходимо было ввести в эксперимент переменный показатель по уровню фосфора в почве. Семена высаживались в почву двух типов: содержащую низкий (1,7 мг Р на 100 г) или средний (внесено 17,2 мг СаНРО₄*2Н₂О на 100 г почвы с низким уровнем Р) уровень фосфора.

В экспериментах анализировали листья четырех экспериментальных групп растений:

1) растения, выросшие без микоризы и при низком содержании фосфора в почве (M^{Γ^-});

2) растения без микоризы, выросшие на почве со средним содержанием фосфора (M^{Γ^+});

3) растения с микоризой на почве с низким содержанием фосфора (M^{Γ^+}),

4) растения с микоризой на почве с высоким содержанием фосфора ($M^{\Gamma^{++}}$).

Листья каждой группы анализировали на разных стадиях развития, т.е. разных сроках после посадки (от 10 до 42 сут.). Выбранные сроки соответствовали стадиям полного развития листьев каждого порядка от “округлого” (стадия 0) до “четвертого” (стадия 4). Кроме того, была учтена сезонность вегетации. Для этого анализировали два поколения растений – весеннее и летнее.

Опτικο-механическая экспериментальная установка

Спектральные измерения светопоглощения листьями растений проведены с помощью оптоволоконного автоматизированного спектрометра AVS-S2000 (Avantes B.V., Netherlands). Комплекс автоматизированных режимов измерения и обработки данных в реальном времени поддерживался программным обеспечением прибора AvaSoft 5.1. Об особенностях поглощения света основными пигментами, участвующими в фотосинтезе – хлорофиллами и каротиноидами – судили по интенсивности отражения света от поверхности листовых пластин в диапазоне 400–800 нм. Источником света служила галогенная лампа КГМ-9 (70 Вт). В качестве осветителя использован стандартный опак-иллюминатор микроскопа ЛЮАММ-К (ЛОМО, СПб., Россия). В его состав помимо лампы входил конденсор, диафрагма и дихроическое зеркало, направляющее свет вертикально вниз на горизонтальную поверхность столика – препаратодителя, где располагались свежесрезанные листья растений в 50 мм от дихроического зеркала. Свет, отраженный от поверхности листьев, поступал вверх через дихроическое зеркало и “красный” широкополосный фильтр в коллимационную систему окулярной приставки ОЛК–2У42, фокусировался на коллиматоре оптоволоконна и направлялся на регистрирующий блок спектрометра (рис. 1).

В калибровочных измерениях было установлено, что, несмотря на единую качественную картину спектра отражения от листовых пластин, амплитудные значения в различных диапазонах волн колебались в пределах единиц процентов в зависимости от конкретного листа и его ориентации. Чтобы избежать разброса данных, вызванного индивидуальными анатомическими и геометрическими факторами листовых пластинок, анализу подвергались одновременно 12 листьев из каждой экспериментальной серии. Листья укладывались на столике в произвольной ориентации сплошным “покровом” \varnothing 15 мм, соответствующим по площади пятну отъюстированного падающего света, а сам столик мог поворачиваться вокруг оптической оси – центра укладки (рис. 2).

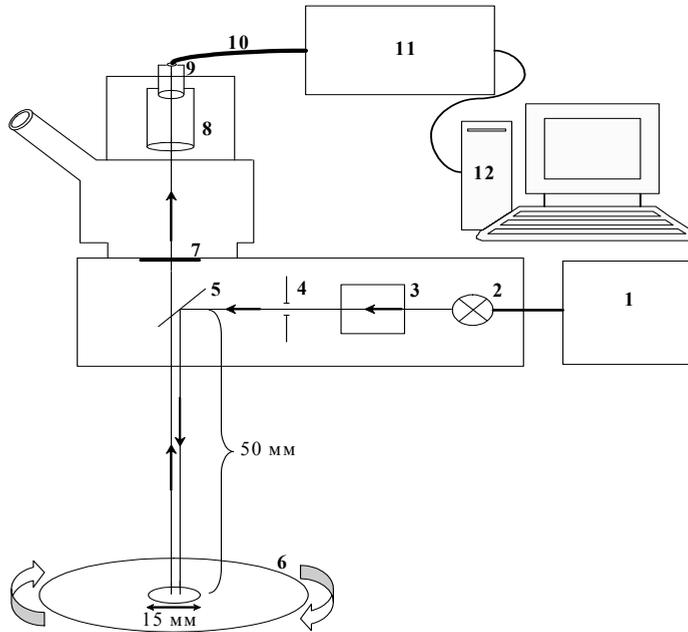


Рис. 1. Схема экспериментальной оптомеханической установки.

- 1 – блок питания; 2 – галогенная лампа; 3 – конденсор; 4 – диафрагма; 5 – дихроическое зеркало;
 6 – столик-препаратоводитель; 7 – “красный” широкополосный фильтр;
 8 – коллиматор окулярной приставки; 9 – коллиматор спектрометра; 10 – оптоволоконный кабель;
 11 – спектрометр AVS-S2000; 12 – компьютер

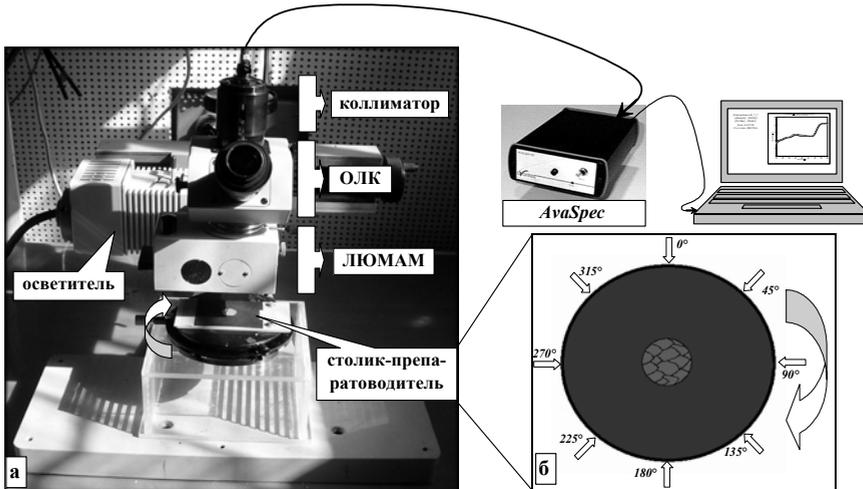


Рис. 2. Блок макроscopicого спектрального анализа с установкой для вращения препарата.
 а – блок макроscopicого спектрального анализа; б – схема устройства для вращения
 препарата; ОЛК – окулярная приставка; ЛЮММ – opak-иллюминатор микроскопа;
 AvaSpec – измерительный блок спектрометра

Для каждой такой укладки спектр отражения регистрировался через каждые 45° оборота столика. Спектральные сканы 8 соответствующих позиций усреднялись.

Регистрация отражения листовых пластинок

Поскольку в установке использован opak-иллюминатор, являющийся одновременно входным оптическим каскадом фотометрической системы, в качестве меры светопоглощения фактически измерялся спектр отражения листовых пластинок. Изменения отраженного света от листьев, вызванные стадией развития растения, его микоризацией и/или добавкой фосфора определялись в сравнении с эталонным отражателем (тефлоном), а также с контрольной группой МГР. Абсолютная величина отраженного света для каждой длины волны и для каждой стадии развития измерялась в единицах Avantes и рассчитывалась в сравнении с эталоном по формуле: $R_{\lambda} = 100 * [Sample_{\lambda}] / [Teflon_{\lambda}]$, а в сравнении с контрольными образцами для каждой стадии развития определялась относительная характеристика светоотражения для каждой длины волны по формуле: $P_{\lambda} = 100R_{\lambda}/R_{\lambda c}$, где: $[Sample_{\lambda}]$ – абсолютное значение отражения от поверхности образца на длине волны λ ; $[Teflon_{\lambda}]$ – абсолютное значение отражения от поверхности тефлона на длине волны λ ; P_{λ} – относительная характеристика изменения светоотражения исследуемыми пигментами; R_{λ} – абсолютное значение величины отражения опытного образца для данной длины волны λ или интегрированное амплитудное ее значение для узкого волнового диапазона; $R_{\lambda c}$ – то же для контрольного образца. Полученные значения P_{λ} интегрировались в отобранных нами в ходе калибровочных экспериментов диапазонах длин волн по критерию различной активности поглощения света. Помимо определения P_{λ} , полученные величины отражения от листовых пластинок различных экспериментальных групп в специфических спектральных областях были сохранены для их использования при расчете интегральных спектрометрических индексов, которые характеризуют активность светопоглощающих субстратов фотосинтеза (Gitelson, 2004).

Статистический анализ

Биологическая повторность данных составляла 12 растений для каждого из вариантов, аналитический коэффициент равен 8 (число позиций столика-препаратоводителя). В каждом тесте уровень значимости был выбран равным 5 %. Различия величин отражения между вариантами растений по каждой фазе развития и между фазами развития для каждого варианта растений проанализированы с использованием парного t -теста.

Результаты

Исследовано влияние микоризации на спектр отражения листовых пластинок на разных стадиях развития растения в условиях низкого и среднего содержания фосфора в почве. На рис. 3, 4 представлена динамика амплитуды спектров отражения листовых пластинок люцерны хмелевидной по мере ее развития. Ак-

тивными областями спектра отражения, по которым вычислялось интегральное значение интенсивности отраженного света, оказались волновые диапазоны 527–574 нм и 709–715 нм.

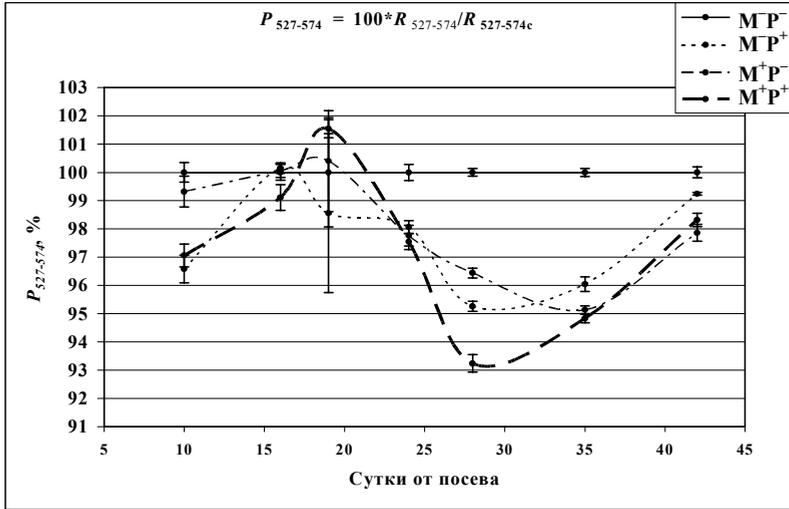


Рис. 3. Динамика относительных характеристик изменения светоотражения ($P_{527-574}$) пигментов листовых пластин растений линии S9m2 люцерны хмелевидной. M⁻P⁻ и M⁺P⁺ – группы растений без микоризы на почве с низким и средним уровнем P_i, соответственно; M⁺P⁻ и M⁺P⁺ – группы растений с микоризой на почве с низким и средним уровнем P_i, соответственно

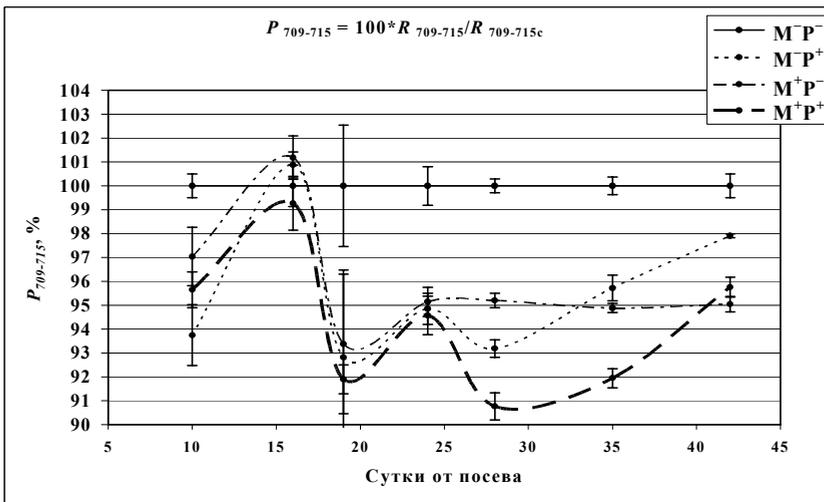


Рис. 4. Динамика относительных характеристик изменения светоотражения ($P_{709-715}$) пигментов листовых пластин растений линии S9m2 люцерны хмелевидной (пояснения см. на рис. 3)

Достоверные различия в спектре отражения 527–574 нм зарегистрированы между группами растений, выращенных в условиях низкого и среднего уровня фосфора в почве (рис. 3). Наиболее ранний отклик на микоризацию зарегистрирован в диапазоне 709–715 нм уже на 10-е сутки от посадки (рис. 4). На 16-е сутки от посадки значения отражения листовых пластин выравниваются относительно контрольного варианта во всех активных диапазонах длин волн (рис. 3, 4).

Как показали результаты микроскопических исследований, в период с 7-х по 16-е сутки от посева, т.е. до фазы развитого первого настоящего листа, происходит становление основных симбиотических структур микоризы (Yurkov, 2007). Вероятно, отсутствие различий в спектре отражения, регистрируемом с 12-х по 16-е сутки от посадки, связано именно с началом развития арбускул и везикул, которые активно заполняли корни фитосимбионта.

Достоверное снижение отражения от пластин трех групп опытных растений в области 709–715 нм по сравнению с контролем наблюдается не позднее 24-х суток от посадки. Именно на этом этапе (на фазе полного развития 2-го настоящего листа) опытные растения переходят в фазу стеблевания. Эти данные можно трактовать в пользу того, что достоверное превышение интенсивности фотосинтеза у опытных групп по сравнению с контролем наблюдается на начальном этапе развития стебля. В последующие сроки отражение листовых пластин опытных групп растений сохранялось на более низком уровне. На последнем анализируемом сроке (42-е сутки от посадки) листья микоризованных растений, выращенных на почве с низким и средним уровнем фосфора (M^+P^- и M^+P^+), имели достоверно более низкое отражение не только в сравнении с контрольной группой M^-P^- , но и в сравнении с группой без микоризы, но выращенной при нормальном фосфорном питании (M^-P^+). Это наблюдалось как в области 527–574 нм, так и в области 709–715 нм. Из рис. 3, 4 видно, что растения этой группы (M^-P^+) имеют показатель отражения наиболее близкий к контролю.

Таким образом, результаты исследования *активных* диапазонов спектра отражения листовых пластин люцерны хмелевидной показали, что микоризованные растения при полном их развитии имеют более низкое отражение, а значит, более высокое поглощение. Это свидетельствует о том, что они обладают более высокой фотосинтетической активностью. В обоих диапазонах динамика показателя фотосинтетической активности качественно однотипна, однако интегральный показатель в диапазоне 709–715 нм представляется более чувствительным (во всяком случае, по амплитуде) к физиологическим изменениям, касающимся аппарата фотосинтеза.

Отметим, что при анализе остальных областей спектра отражения показано, что максимальной погрешностью обладал диапазон длин волн вблизи инфракрасного спектра – *NIR*-диапазон – 750–780 нм. В этой области происходит резкое увеличение отражения, которое даже для одного и того же листа существенно варьировало при различной его ориентации. Здесь обычно фиксируется положение “красной кромки” – λ_{RE} (Curran, 1990; Gitelson, 1996). Очевидно, ис-

следование в диапазоне 750–780 нм в данных методических условиях является наименее информативным.

Наименее изменчивым оказался диапазон 682–690 нм. Достоверные различия между 4 группами растений зафиксированы только на 28-е сутки от посадки (рис. 5). С одной стороны, расчет спектральных показателей в данном диапазоне более точен (погрешности в этой области несколько ниже, чем в остальных), но с другой стороны, по-видимому, он явно менее селективен, во всяком случае, в экспериментах с микоризацией растений.

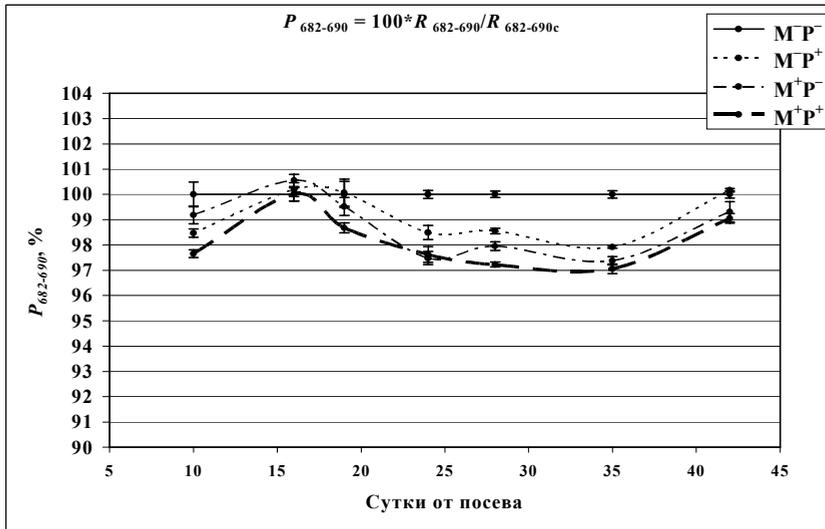


Рис. 5. Динамика относительных характеристик изменения светоотражения ($P_{682-690}$) пигментов листовых пластин растений линии S9m2 люцерны хмелевидной (пояснения см. на рис. 3)

Заключение

Результаты апробации разработанной методики показали ее преимущества перед классическими биохимическими методами оценки интенсивности фотосинтеза по ряду позиций. Во-первых, как всякий неинвазивный подход, спектрофотометрия *in vivo* более адекватна для анализа биологических процессов в реальном времени и вносит минимум артефактов. Во-вторых, неинвазивным методом определяется активность пигментов, содержащихся в нативных хлоропластах, связанных с цитоплазмой функционирующей клетки. Очевидно, именно в этих условиях можно судить о регистрации активных форм хлорофиллов, работающих в светособирающих комплексах фотосистем. Таким образом, этот метод более селективен и, следовательно, более чувствителен. В-третьих, для выявления достоверных различий между экспериментальными и контрольными массивами достаточно нескольких миллиграммов свежих листьев и нескольких минут измерения вместо нескольких десятков миллиграммов листовой массы и длительных, сложных процедур биохимического анализа. Наконец, перспек-

тивной областью применения отобранных нами активных диапазонов относительных показателей отражения (P_{λ}) является расчет спектрометрических индексов отражения, таких, как фотохимический – *PRI*, хлорофильный – *ChlRI*, каротиноидный – *CRI* и др. (Gamon, 1992; Gitelson, 2002, 2003; Gitelson, 2004). Эти индексы используются в полевых условиях для нужд сельского хозяйства, а также для наземного, воздушного или космического мониторинга состояния природных ландшафтов (Gitelson, 1994; Henebry, 2004).

Таким образом, в настоящем исследовании были выбраны основные активные диапазоны длин волн для растений люцерны хмелевидной и показаны основные возможности и преимущества неинвазивных спектрометрических исследований фотосинтетической активности этого растения в условиях микорризации и различного уровня фосфора в почве.

Благодарности

Авторы благодарят проф., д-ра биол. наук М.Ф. Шишову (СПбГУ), ст. науч. сотрудника Л.М. Якоби (ВНИИ с.-х. микробиологии), канд. с.-х. наук Г.В. Степанову (ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса) за помощь в проведении экспериментов.

Исследование поддержано грантом РФФИ-офи 06-04-08268, грантом CRDF ST-012 и Министерством образования РФ.

Литература

1. Bago B., Pfeiffer P.E., Shachar-Hill Y. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas // *Plant Physiol.*, 2000, vol. 124, p. 949–957.
2. Curran P.J., Dungan J.L., Gholz H.L. Exploring the relationship between reflectance red edge and chlorophyll content in slash pine // *Tree Physiol.*, 1990, vol. 7, p. 33–48.
3. Duc G., Trouvelot A., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. First report of non-mycorrhizal plant mutants (*Myc⁻*) obtained in pea (*Pisum sativum* L.) and fababean (*Vicia faba* L.) // *Plant Sci.*, 1989, vol. 60, p. 215–222.
4. Estrada-Luna A.A., Davies F.T.Jr., Egilla J.N. Mycorrhizal fungi enhancement of growth and gas exchange of micropropagated guava plantlets (*Psidium guajava* L.) during *ex vitro* acclimatization and plant establishment // *Mycorrhiza*, 2000, vol. 10, p. 1–8.
5. Gamon J.A., Peñuelas J., Field C.B. A narrow-waveband spectral index that tracks diurnal changes in photosynthetic efficiency // *Remote Sens. Environ.*, 1992, vol. 41, p. 35–44.
6. Gitelson A.A., Merzlyak M.N. Spectral reflectance changes associated with autumn senescence of *Aesculus hippocastanum* L. and *Acer platanoides* L. leaves: Spectral features and relation to chlorophyll estimation // *J. Plant Physiol.*, 1994, vol. 143, p. 286–292.
7. Gitelson A.A., Merzlyak M.N., Lichtenthaler H.K. Detection of red edge position and chlorophyll content by reflectance measurements near 700 nm // *J. Plant Physiol.*, 1996, vol. 148, p. 501–508.
8. Gitelson A.A., Zur Y., Chivkunova O.B., Merzlyak M.N. Assessing carotenoid content in plant leaves with reflectance spectroscopy // *Photochemistry and Photobiology*, 2002, vol. 75, N 3, p. 272–281.
9. Gitelson A.A., Gritz Y., Merzlyak M.N. Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher leaves // *J. Plant Physiol.*, 2003, vol. 160, p. 271–282.
10. Gitelson A.A., Merzlyak M.N. Non-destructive assessment of chlorophyll, carotenoid and anthocyanin content in higher plant leaves: Principles and algorithms/ In *Remote Sensing for Agriculture and the Environment*. Eds. S. Stamatiadis, J.M. Lynch, J.S. Schepers. – Greece, 2004, p. 78–94.



11. Henebry G.M., Vina A., Gitelson A.A. The wide dynamic range vegetation index and its potential utility for gap analysis // *Gap Analysis Bulletin*, 2004, vol. 12, p. 1–5.
12. Jacobi L.M., Petrova O.S., Tsyganov V.E. Effect of mutations in the pea genes *Sym33* and *Sym40*. I. Arbuscular mycorrhiza formation and function // *Mycorrhiza*, 2003, vol. 13, p. 3–7.
13. Pfeiffer P.E., Douds Jr.D.D., Bécard G., Shachar-Hill Y. Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza // *Plant Physiol.*, 1999, vol. 120, p. 587–598.
14. Smith S.E., Read D.R. *Mycorrhizal Symbiosis* (2nd edition). – San Diego: Academic Press, 1997. – 605 p.
15. Yurkov A.P., Jacobi L.M., Kojemyakov A.P., Dzyubenko N.I. Study of symbiotic efficiency in black medic (*Medicago lupulina*) with arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* // Abstr. in The XV Congress of European Mycologists. – St.-P., September 16–21 2007. – 236 p.

Ключевые слова: оптико-механическая установка, отражение света листьями растений, неинвазивный анализ.