Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

На правах рукописи

Сухова Екатерина Михайловна

ОЦЕНКА ПРИМЕНИМОСТИ НОРМАЛИЗОВАННЫХ ИНДЕКСОВ ОТРАЖЕНИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ЛОКАЛЬНОГО И СИСТЕМНОГО ДЕЙСТВИЯ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ВЫСШИЕ РАСТЕНИЯ

1.5.2 — биофизика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

> Научный руководитель: кандидат биологических наук Сухов В.С.

Нижний Новгород 2022

оглавление

ПЕРЕЧЕНЬ ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Оптические методы дистанционного мониторинга	12
1.2. Индексы отражения и их связь с физиологическими процессами	17
1.2.1. Вегетационные индексы отражения	18
1.2.2. Водные индексы отражения	19
1.2.3. Пигментные индексы отражения	20
1.2.4. Фотохимический индекс отражения	21
1.3. Пространственная и временная неоднородность оптических свойств расте-	
ний	23
ГЛАВА 2. Материалы и методы	27
2.1. Объекты исследования	27
2.2. Индукция локального и системного действия неблагоприятных абиотиче-	
ских факторов на растения	27
2.3. Измерения фотосинтетической активности с использованием РАМ-	
флуориметра и инфракрасного газоанализатора	29
2.4. Оценка закисления люмена на основании измерения светорассеяния на 535	
нм листьями растений	33
2.5. Измерение спектральных характеристик отраженного света у растений и	
основные методы исследования индексов отражения	34
2.6. Измерение содержания воды в побегах растений	40
2.7. Математическое моделирование фотосинтетической активности листа	40
2.8. Статистическая обработка результатов	49
ГЛАВА 3. КОМПЛЕКСНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ НОРМАЛИЗО-	
ВАННЫХ ИНДЕКСОВ ОТРАЖЕНИЯ ПРИ ДЕЙСТВИИ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ	
АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ	50
3.1. Комплексное исследование изменений индексов отражения листа в услови-	
ях кратковременного водного дефицита	50
3.2. Комплексное исследование влияния повышенной температуры на индексы	

отражения листа	58
3.3. Комплексное исследование индексов отражения листа в условиях длитель-	
ной почвенной засухи	62
3.4. Комплексное исследование индексов отражения при локальном поврежде-	
нии и распространении электрических сигналов	66
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИМЕНИМОСТИ ФОТОХИМИЧЕСКОГО ИН-	
ДЕКСА ОТРАЖЕНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ	
ДЕЙСТВИЯ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ И АНАЛИЗ	
МЕХАНИЗМОВ ЕГО ИЗМЕНЕНИЙ	70
4.1. Мета-анализ литературных данных о влиянии условий измерения на корре-	
ляцию между фотохимическим индексом отражения и активностью фотосинтети-	
ческих процессов	70
4.2. Разработка нового метода регистрации фотохимического индекса отраже-	
ния с использованием активного освещения листа вспышками желто-зеленого из-	
мерительного света	72
4.3. Исследование влияния освещения, засухи и повышенной температуры на	
фотохимический индекс отражения	76
4.3.1. Исследование влияния интенсивности освещения на фотохимический	
индекс отражения листьев растений	76
4.3.2. Исследование влияния длительности освещения на связь фотохимиче-	
ского индекса отражения с показателями фотосинтеза	82
4.3.3. Исследование связи фотохимического индекса отражения с изменени-	
ями рН в хлоропластах при действии света	85
4.3.4. Исследование модифицированных фотохимических индексов отраже-	
ния и их связи с параметрами фотосистем I и II	87
4.3.5. Исследование изменений фотохимического индекса отражения в усло-	
виях водного дефицита и повышенной температуры	95
4.4. Изменения фотохимического индекса отражения при локальном поврежде-	
нии и индукции электрического сигнала у растений	99
ГЛАВА 5. ПРОСТРАНСТВЕННАЯ НЕОДНОРОДНОСТЬ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ	
ФОТОХИМИЧЕСКОГО ИНДЕКСА ОТРАЖЕНИЯ И ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ	
ХАРАКТЕРИСТИК ЛИСТА КАК ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ ВОЗ-	

ДЕЙСТВИЯ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ФАКТОРОВ НА РАСТЕНИЯ	103
5.1. Исследование неоднородности распределения фотохимического индекса	
отражения в плоскости листа при индукции водного дефицита	103
5.2. Исследование неоднородности распределения активности световой стадии	
фотосинтеза у гороха при индукции водного дефицита	104
5.3. Исследование путей формирования неоднородности фотосинтетического	
ответа у листа с использованием математической модели	105
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	113
ВЫВОДЫ	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	117

ПЕРЕЧЕНЬ ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВП – вариабельный потенциал

ИК – инфракрасное излучение

ЭТЦ – электрон транспортная цепь хлоропластов

А_{hv} – ассимиляция углекислого газа в процессе фотосинтеза

AL – актиничный свет в РАМ-флуориметрии

Chl a – хлорофилл a

Chl b – хлорофилл b

Fv/Fm – максимальный квантовый выход фотосистемы II

gs – проводимость устьиц растений для углекислого газа

GYL – импульсы жёлто-зелёного света

LEF – линейный поток электронов электрон-транспортной цепи фотосинтетического аппарата растений

LS (light scattering) – неинвазивные метод оценки изменений pH люмена, базирующийся на измерении светорассеяния листа на длинах волн 530-546 нм

LUE – эффективность использования света при ассимиляции CO₂ в процессе фотосинтеза

ML – измерительный свет в РАМ-флуориметрии

NPQ – нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла а

NPQ_F – быстро-релаксирующая компонента нефотохимического тушения хлорофилла а, энергозависимая компонента нефотохимического тушения

PAM – pulse amplitude modulation fluorometry, флуориметрия, основанная на использовании вспышек света различной модуляции

РАR – фотосинтетически активный свет

PRI – фотохимический индекс отражения

RI – индекс отражения

RWC – относительное содержание воды в побегах растений

qP - коэффициент фотохимического тушения

SP – насыщающие вспышки в РАМ-флуориметрии

YII – эффективный квантовый выход фотосистемы II

YI – эффективный квантовый выход фотосистемы I

YNA – фракция реакционных центров I, которые не были окислены из-за ограничения на акцепторной стороне

YND – фракция реакционных центров I, которые не были окислены из-за ограничения на донорной стороне

введение

Актуальность

Растения играют важную роль в жизни Земли, являясь источником питательных веществ для человека и животных, а также выполняя средообразующую и климатообразующую роль (Makarieva, Gorshkov, 2007; Ellison et al., 2017). Однако растения ведут при-крепленный образ жизни, что повышает их уязвимость к действию неблагоприятных факторов. Влияние засухи, избыточного света и высокой температуры снижает продук-тивность растений и может ухудшать качество урожая (Fahad et al., 2017). Дистанцион-ный мониторинг состояния растений является основой для своевременного принятия защитных мер и поддержания продуктивности растений (Berni et al., 2014; Sun et al., 2021).

В настоящее время методы дистанционного мониторинга состояния растений активно развиваются; одно из важных направлений такого развития базируется на выявлении связей параметров растений и их оптических характеристик. Основные методы оптического дистанционного мониторинга включают в себя измерение флуоресценции хлорофилла, тепловидение, RGB-имиджинг и анализ спектральных характеристик отраженного растениями света (Jang et al., 2020). Последнее является наиболее перспективным направлением благодаря сильной связи таких характеристик с физиологическими показателями, биохимическим составом и структурой растений (Xue, Su, 2017).

Однако анализ полных спектров отраженного света является относительно трудоёмким и несет значительную избыточную информацию, что осложняет интерпретацию результатов. Использование нормализованных индексов отражения, рассчитанных на основании интенсивностей отраженного света на ограниченном количестве узких спектральных диапазонов (обычно две или три длины волны, связанные с определенными физиологическими параметрами или пигментами), упрощает интерпретацию результатов измерений и позволяет технически реализовать более простые системы дистанционного мониторинга (Jang et al., 2020). Поиск новых индексов отражения, эффективно выявляющих действие неблагоприятных факторов на активности физиологических процессов, расширяет возможности существующих методов оценки состояния растений и позволяет разрабатывать новые подходы.

Большой интерес для исследователей представляет и более детальные исследования применимости ранее предложенных индексов отражения; в частности, в литературе активно рассматривается фотохимический индекс отражения (photochemical reflectance index, PRI), который обычно рассчитывается на основании интенсивности отраженного света при 531 и 570 нм (Gamon et al., 1992; Zhang et al., 2016). Этот индекс потенциально чувствителен к быстрым изменениям фотосинтетических процессов (прежде всего, стрессовым изменениям) и широко применяется в системах дистанционного мониторинга; однако, существенной проблемой использования PRI является сильная вариативность его связи с активностью фотосинтеза (Zhang et al., 2016).

Развитие методов оценки состояния растений на основе спектральных характеристик отраженного света может базироваться не только на усовершенствовании измеряемых индексов, но также на оценке пространственного распределения таких индексов. В частности, известно, что важной особенностью растений является неоднородность их оптических свойств в пространстве (Ollinger, 2011). Она может быть обусловлена пространственными различиями как в структуре листьев и кроны растений (Kattenborn et al., 2019; Knapp, Carter, 1998), так и в составе и соотношении пигментов (Esteban et al., 2015). Источником оптической неоднородности может быть также пространственная неоднородность распределения фотосинтетической активности по растению (Rascher, Nedbal, 2006; Tikkanen et al., 2012), так как такая активность тесно связана с отражением света растениями в видимом диапазоне (Kume et al., 2018). Можно предполагать, что исследование неоднородности распределения индексов отражения может иметь существенное значение для поиска новых критериев действия неблагоприятных факторов на растения.

Таким образом, развитие методов оценки влияния неблагоприятных абиотических факторов на растения, основанных на измерениях индексов отражения, остается важной научной задачей, требующей комплексного исследования.

Цель и задачи

Целью исследования была оценка применимости нормализованных индексов отражения для выявления локального и системного действия неблагоприятных абиотических факторов на высшие растения (на примере водного дефицита, почвенной засухи,

повышенной температуры и локального ожога). Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выполнить комплексное исследование изменений нормализованных индексов отражения при локальном и системном действии неблагоприятных абиотических факторов на растения.

2. Исследовать эффективность использования фотохимического индекса отражения для оценки состояния растений в условиях действия на них неблагоприятных факторов.

3. Исследовать пути быстрых изменений фотохимического индекса отражения при действии неблагоприятных факторов.

4. Исследовать возможность использования пространственной неоднородности распределения фотохимического индекса отражения и фотосинтетических характеристик листа для выявления действия неблагоприятных факторов на растения.

Научная новизна работы

На основе комплексного исследования достоверности различий индексов отражения листьев в опыте и контроле были предложены новые индексы, показывающие высокую эффективность для выявления изменений состояния растений при засухе.

Было показано, что локальные ожоги и индуцированные ими электрические сигналы вызывают выраженные изменения спектров отражения света растениями, которые проявляются в изменениях нормализованных индексов отражения.

Была показана связь фотохимического индекса отражения с быстрорелаксирующей компонентой нефотохимического тушения (NPQ_F) и квантовым выходом фотосистемы I (YI).

Был разработан метод измерения фотохимического индекса отражения на основе применения импульсов желто-зеленого измерительного света, который позволяет снизить влияние фонового освещения при измерении индекса.

Была обнаружена стимуляция пространственной неоднородности активности световой стадии фотосинтеза и фотохимического индекса отражения у листа при действии абиотических факторов и предложен потенциальный механизм ее возникновения.

Научно-практическая значимость работы

Полученные результаты (в частности, разработка новых нормализованных индексов отражения, выявление большей эффективности светоиндуцированных изменений PRI и др.) являются основой для создания новых методов дистанционного мониторинга состояния растений.

Предложенный метод измерения фотохимического индекса отражения на основе использования импульсов измерительного света повышает точность измерений показателя. На основе предложенного метода разработана новая система PRI-имиджинга (совместно с ИПФ РАН), которая может быть использована как инструмент для проксимального мониторинга состояния растений.

Выявленная стимуляция пространственной неоднородности фотосинтетического ответа и индексов отражения может быть использована в качестве дополнительного критерия для выявления действия неблагоприятных факторов на растения при их дистанционном мониторинге.

Собственный вклад автора в исследования

На всех этапах выполнения работы автор принимал личное участие в её проведении, включая планирование, подготовку и выполнение экспериментов, анализ полученных результатов (включая разработку программных инструментов для анализа данных) и последующее их обсуждение. Автор осуществлял разработку, параметризация и верификацию математической модели, включая разработку программного инструмента для ее численного решения; разработанная модель были использована автором в качестве дополнительного инструмента исследования. Автор принимал ключевое участие в написании научных статей и представлении результатов исследований на всероссийских и международных научных конференциях.

Положения, выносимые на защиту

1. Предложены два новых нормализованных индекса отражения, рассчитываемые на основании длин волн 613 и 605 нм и длин волн 670 и 432 нм, которые имеют высокую чувствительность к действию на растения кратковременного водного дефицита, почвенной засухи и высокой температуры.

2. Локальное повреждение (ожог) и индуцированные им распространяющиеся электрические сигналы вызывают изменения индексов отражения у растений, включая значительные изменения фотохимического индекса отражения.

3. Фотохимический индекс отражения является чувствительным показателем развития фотосинтетических ответов растения при действии неблагоприятных абиотических факторов; однако, эффективность его применения может быть повышена путем увеличения точности измерений индекса (с использованием импульсов желто-зеленого измерительного света), анализа светоиндуцированных изменений PRI и применения модифицированных фотохимических индексов отражения с большей измерительной длиной волны (в частности, 555 нм).

4. Возрастание пространственной неоднородности активности световой стадии фотосинтеза и фотохимического индекса отражения в плоскости листа является ответом на действие засухи и сильный свет. Механизмы такого возрастания могут быть связаны с состоянием устьиц.

Апробация работы

Основные результаты диссертационного исследования были представлены и обсуждены на "8th International Conference Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability-2017" (Индия, Хайдерабад, 2017); "VIII Съезде Российского фотобиологического общества. Всероссийская конференция Современные проблемы фотобиологии" (Шепси, 2017); "Втором международном агроэкологическом форуме" (Санкт-Петербург, 2021); "IX Съезде Российского фотобиологического общества. Всероссийская конференция Современные проблемы фотобиологии" (Шепси, 2021).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 18 работ, включая 1 патент и 14 статей в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus), рекомендованных ВАК, в том числе 2 обзора.

Конкурсная поддержка работы

Проведенные исследования были выполнены при поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований, включая проекты, в которых диссертант являлся

руководителем (проекты 18–34-00644-мол_а, 20-016-00234 А и 20-316-80030 мол_эв_а) и исполнителем (проекты 20-34-90086 Аспиранты), а также грантов Российского научного фонда (проекты 14-26-00098 и 17-76-20032, исполнитель).

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 133 страницах машинописного текста и содержит 46 рисунков, 4 таблицы, 36 уравнений. Работа состоит из введения, обзора литературы по исследуемой тематике, описания применяемых методов, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 183 источника, из которых 179 иностранные.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Оптические методы дистанционного мониторинга

Растения играют важную роль в различных сферах жизни человека. Одной из наиболее значимых областей их использования является сельское хозяйство, которое обеспечивает продовольственную безопасность человечества, а также поставляет сырье для многих отраслей производства. При этом растениеводство остается одной из самых трудоемких и энергозатратных отраслей и связано со значительными потерями и рисками. Другая роль растений обусловлена их участием в средообразовании и климатообразовании. В частности, леса поглощают избыточный углекислый газ, участвуют в температурной регуляции, перемещении воздушных и водных потоков и защищают реки от пересыхания (Makarieva, Gorshkov, 2007; Ellison et al., 2017); нарушение таких процессов пагубно отражается на климате и качестве жизни человека (Gornall et al., 2010; Madani et al., 2020; Akhtar et al., 2021).

Развитие методов дистанционного мониторинга состояния растений необходимо для раннего выявления и своевременного решения проблем при их культивировании, а также для оценки динамики характеристик растительных экосистем естественного или искусственного происхождения в тех или иных условиях среды (Zhang et al., 2016). Наиболее перспективными для мониторинга являются оптические методы, которые характеризуются неинвазивностью (т. е. не требуют повреждения растительных объектов), высокой производительностью (в частности, за счет дистанционных высокоскоростных измерений) и информативностью (обусловленной тесной связью оптических характеристик растения и его физиологических процессов), а также – низким влиянием на окружающую среду (Jang et al., 2020).

Среди ключевых групп оптических методов исследования растений следует отметить измерение и анализ флуоресценции хлорофилла (включая, активное и пассивное измерение), термографию, измерение и анализ спектральных характеристик отраженного растениями света, а также RGB-имиджинг (Рис.1.1). Эти методы широко используются для оценки состояния растений при их культивировании как в лабораториях и тепличных комплексах, так и в условиях поля; кроме того, подобные методы находят значительное применение в наблюдениях за состояниям растений в естественных условиях (Berni et al., 2014; Zhang et al., 2016; Jang et al., 2020).



(б)

Рис.1.1. Оптические области, в которых регистрируют флуоресценцию хлорофилла, термографию, отраженный растениями свет и RGB-имиджинг (Kior et al., 2021) (a); примеры оптических методов имиджинга растений (на рисунке использованы изображения, полученные коллективом кафедры) (б).

RGB-имиджинг, т.е. анализ простых цветных изображения исследуемых объектов, является важным методом дистанционного мониторинга и характеризуется технической простотой и доступностью для пользователей (Jang et al., 2020; Guo et al., 2021). Цветные камеры, используемые для такого имиджинга, измеряют свет в трех широких спектральных полосах красного, синего и зелёного света (Рис.1.1а); также эти камеры имеют слабую чувствительность в ближнем инфракрасном свете (Salamati et al., 2012). RGB-имиджинг может быть использован для дистанционного мониторинга растений на различных пространственных уровнях (начиная от листа и заканчивая экосистемой) и в широком временном масштабе; традиционно, метод используется для наблюдения за медленными изменениями (начиная от часов и дней) (Рис.1.2).



Рис.1.2. Использование оптических методов (включая измерение пассивной и активной флуоресценции, гипер- и мультиспектральный имиджинг, термографию, RGB имиджинг) на различных временных и пространственных масштабах (Kior et al., 2021).

RGB имджинг широко используется для морфометрического анализа (например, оценки прироста биомассы (Ballesteros et al., 2018), индекса площади листа (Córcoles et al., 2013)), распознания и классификации растений (Hung et al., 2014; Plesoianu et al., 2020), оценки распространённости растений в экосистемах (Schiefer et al., 2020; Onishi, Ise, 2021) и др. Однако анализ RGB изображений сопряжен с рядом проблем. В частности, RGB изображения очень чувствительны к флуктуациям интенсивности света и порывам ветра, меняющим положения частей растений, которые часто наблюдаются в условиях открытого грунта (Guo et al., 2021). Кроме того, калибровка RGB камер сложна из-за эффекта нелинейной гамма-коррекции (Sun et al., 2021). Также стоит отметить, что для преобразования RGB изображения в поверхностную модель необходимо большое количество интерполяций, что снижает точность и надежность расчётов (Sun et al., 2014).

2021). Наконец, структурный анализ растительного покрова на основе RGB изображений достаточно сложен и требует специального программного обеспечения (Sun et al., 2021).

Другим перспективным методом мониторинга растений является измерение и анализ флуоресценции хлорофилла а, которая непосредственно связана с процессами перераспределения энергии в фотосинтетическом аппарате (Kalaji et al., 2014). Методы измерения флуоресценции хлорофилла можно разделить на активные (при этом активная флуоресценция индуцируется специальным измерительным светом с контролируемой интенсивностью) и пассивные (при этом пассивная флуоресценция индуцируется фоновым солнечным светом) (Porcar-Castell et al., 2014). Флуоресценция хлорофилла а наблюдается в спектральном диапазоне 650-750 нм, максимум эмиссии флуоресценции находится около 680 нм (Pedrós et al., 2008) (Рис.1.1). Активная флуоресценция может быть использована при мониторинге для оценки фотосинтетической активности в масштабе от листа до растения (Рис.1.2). Однако, использование активного модулированного освещения растений на уровне растительного покрова и экосистем, которое необходимо для такого метода регистрации флуоресценции, технически сложно и трудоемко (Porcar-Castell et al., 2014); проблемы регистрации связаны, прежде всего, с большим расстоянием между камерой и растением, что значительно снижает интенсивность падающего на растения измерительного света, и низкой интенсивностью сигнала флуоресценции от растения. В случае использования Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) флуориметрии, которая является наиболее информативным методом измерения активной флуоресценции (Maxwell, Johnson, 2000; Müller et al., 2001; Porcar-Castell et al., 2014), требуется дополнительное освещение растения светом высокой интенсивности (насыщающий свет), что еще более затрудняет измерения на значительных расстояниях от растительных объектов.

Напротив, регистрация пассивной флуоресценции не требует искусственного освещения, ее индукция происходит при естественном солнечном освещении (Meroni et al., 2009; Porcar-Castell et al., 2014). Анализ пассивной флуоресценции базируется на применении линий Фраунгофера, включая линию водородного поглощения (656 нм) и теллурическое поглощение кислорода (687 и 760 нм) (Meroni et al., 2009); при этом, интенсивность флуоресценции оценивается на основании различий в интенсивности измеряемого света в пределах одной из линий и вблизи такой линии. Развитие метода анали-

за пассивной флуоресценции является важной задачей дистанционного мониторинга растений, однако, регистрация индуцированной солнечным светом флуоресценции требует сложного оборудования, а интерпретация результатов измерений затрудняется нелинейной связью между абсолютной интенсивностью флуоресценции и параметрами фотосинтетических процессов (Meroni et al., 2009).

Изменения температуры растений также могут быть информативными и использоваться для дистанционного мониторинга. В термографии используется диапазон длин волн от 7500 до 14000 нм (Jang et al., 2020) (Рис.1.1). Термография в основном применяется для оценки активности транспирации растений (Jones, 1999; Jang et al., 2020), так как именно интенсивность транспирации может существенно влиять на температуру листа. При этом известно, что транспирация регулируется открытием/закрытием устьиц, что предотвращает перегревание растений при повышении температуры окружающей среды (Jones, 1999) и контролирует потери воды в условиях засухи (Jones, Leinonen, 2003). На основании этого температура листа может быть использована для расчета индекса проводимости устьиц (Jones, 1999), что, однако, требует калибровочных процедур, реализация которых в полевых условиях может быть затруднена (необходимо применение сухого и влажного стандартов, которые позволяют снизить влияние температуры окружающей среды на измерения). Помимо действия неблагоприятных факторов абиотической природы (засуха, нагрев), изменения температуры листа могут быть также вызваны заболеваниями растений, которые оказывают существенное влияние на интенсивность транспирации (Mahlein, 2016). Таким образом, влияние неблагоприятных факторов, модифицирующих процессы транспирации, может быть оценено на основе термографии. Тем не менее, пространственное разрешение термографии ниже, чем у RGBимиджинга, а эффективность этого метода в значительной степени зависит от температуры окружающей среды (Jang et al., 2020).

Исследования спектральных характеристик отраженного света, которые реализуются в виде мультиспектрального (измерение интенсивности отраженного света в ограниченном наборе спектральных полос) или гиперспектрального (измерение спектра отражения в каждой точке изображения) имиджинга, являются еще одним перспективным направлением дистанционного мониторинга, благодаря сильной связи отраженного света в конкретных спектральных диапазонах с морфометрическими, физиологическими и биохимическими показателями растений (Peñuelas, Filella, 1998; Merzlyak et al., 1999).

Важно отметить, что измеряемый при дистанционном мониторинге отраженный свет представляет собой комбинацию отраженного поверхностью света и обратнорассеянного света, исходящего из глубины листа; именно последняя составляющая является наиболее значимой для оценки состояния растений, так как обеспечивает связь отраженного света со спектром его поглощения в ткани растения.

При реализации мульти- и гиперспектральном имиджинга используются различные спектральные диапазоны, включая видимый свет, поглощение которого зависит прежде всего от пигментного состава и состояния пигментов, ближний инфракрасный свет (NIR), поглощение которого определяется структурными особенностями растительной ткани, и коротковолновой инфракрасный свет (SWIR), поглощение которого в значительной степени зависит от содержания воды в растении (Puc.1.1) (Peñuelas, Filella, 1998; Kior et al., 2021).

Мульти- и гиперспектральный имиджинг широко используется в дистанционном мониторинге растений, а также – при разработке моделей для прогнозирования продуктивности сельскохозяйственных и природных экосистем (Xue, Su, 2017). Однако использование полных спектров отражения значительно усложняет измерения и исследование отраженного света, а в случае мультиспектрального имиджинга измерения таких спектров невозможны. Вследствие этого, в работах в области дистанционного мониторинга состояния растений часто используются так называемые индексы отражения: специализированные и, обычно, безразмерные (нормализованные) показатели, рассчитанные на основе интенсивности отраженного света на двух, трех или, реже, более длинах волн (Kior et al., 2021). Разнообразные индексы отражения могут быть использованы в качестве показателей различных аспектов состояния растений и, в частности, служить индикаторами роста и развития растительного организма или действия на него неблагоприятных абиотических факторов.

1.2. Индексы отражения и их связь с физиологическими процессами

Индексы отражения широко используются в дистанционном мониторинге растений; в настоящее время их количество очень велико. При этом, значительную часть индексов отражения можно отнести к одной из основных групп: вегетационные индексы, водные индексы и пигментные индексы; кроме того, отдельно может быть рассмотрен фотохимический индекс отражения (Photochemical Reflectance Index, PRI), который чув-

ствителен к наиболее быстрым изменениям фотосинтетической активности (Zhang et al., 2016; Kior et al., 2021).

1.2.1. Вегетационные индексы отражения

Вегетационные индексы используются для оценки темпов прироста биомассы, что является важным показателем благополучия растений. Эти индексы в целом предназначены для длительных наблюдений за состоянием растений (от нескольких недель до десятков лет (Moreira et al., 2019; Ustin, Middleton, 2021)).

Нормализованный вегетационный индекс (Normalized Difference Vegetation Index, NDVI) является одним из наиболее широко используемых вегетационных индексов в мониторинге растений (Xue, Su, 2017; Huang et al., 2021). Его рассчитывают на основании интенсивности отражения света в красном (R_{Red}) и ближнем инфракрасном (ИК) (R_{NIR}) диапазонах (Rouse et al. 1974) как $\frac{R_{\text{Red}} - R_{\text{NIR}}}{R_{\text{Red}} + R_{\text{NIR}}}$. Отражение света в красном диапазоне связано с содержанием фотосинтетических пигментов и показывает общее количество фотосинтезирующих тканей растений, а ближний ИК в меньшей степени связан с содержанием пигментов и используется в качестве референсной длины волны (Xue, Su, 2017). Для NDVI считается, что значения около 0 показывают измерения почвы, а значения от 0.5 – до 0.7 показывают измерения растений (Xue, Su, 2017); при этом снижение величины NDVI показывает ухудшение состояния растений. В многочисленных исследованиях было показано, что применение NDVI эффективно для оценки различных показателей растений, включая общую биомассу (Zhu, Liu, 2015), продуктивность растений (Vicente-Serrano et al., 2016; Hinojo-Hinojo, Goulden, 2020), индекс площади листа (Jiang et al., 2005; Tian et al., 2017), содержание хлорофилла в листьях (Pastor-Guzman et al., 2015) и др.

Однако на результаты измерения NDVI может существенно влиять атмосферный или почвенный фон. В частности, атмосферное влияние обусловлено наличие водяного пара, облаками, прозрачностью и др. (Myneni, Asrar, 1994; Xue, Su, 2017); показано, что атмосфера рассеивает, в основном, видимый свет, а поглощает ближний ИК (Myneni, Asrar, 1994). Атмосферное влияние было снижено путем применения модифицированных вегетационных индексов IAVI (Atmospherically Effect Resistant Vegetation Index) (Zhang et al., 1996) и ARVI (Atmospherically Resistant Vegetation Index) (Kaufman, Tanré,

1992), которые опираются на использование поправок в виде разности между интенсивностями отраженного света в красном и синем спектральном диапазоне.

Влияние фона почвы связано, прежде всего, с её цветом, яркостью, влажностью, структурой, рельефом и др. (Baret et al., 1993; Xue, Su, 2017). Эффект почвы становится более заметен при разреженной растительности: в этом случае отражение красного света увеличивается, а ближнего ИК снижается (Xue, Su, 2017). Снижение влияния почвенного фона осуществляется путем использования модифицированных вегетационных индексов SAVI (Soil-adjusted Vegetation Index) (Huete, 1988) и OSAVI (Optimized Soil-Adjusted Vegetation Index) (Rondeaux et al., 1996), которые базируются на введении поправочных коэффициентов, минимизирующих влияние фона почвы.

В целом, вегетационные индексы показывают высокую эффективность для оценки состояния растений при их культивировании и в естественных экосистемах (Glenn et al., 2008). Их широко используют на беспилотных летательных аппаратах и спутниковых системах как для локальных наблюдений за растительностью, так и для реализации мировых программ в области дистанционного мониторинга растительного покрова (Ustin, Middleton, 2021).

1.2.2. Водные индексы отражения

Вода играет важную роль в росте и развитии растений. Оценка содержания воды необходима, в частности, для контроля полива и принятия мер для облегчения перенесения засухи (например, опрыскивание растений гормонами (Ullah et al., 2018)). Основные полосы поглощения света водой находятся в пределах 800–2500 нм (Kokaly et al., 2003). При этом, в диапазоне 750–900 нм поглощение света является низким, а на длинах волн около 1240, 1450 и 1940 нм наблюдаются максимумы поглощения света водой (Wu et al., 2009). Комбинации длин волн с сильным отражением света (референсные длины волн) с длинами волн со слабым отражением света и высоким его поглощением водой, широко используются для расчета водных индексов отражения, включая NDWI (Normalized Difference Water Index), NMDI (Normalized Multi-band Drought Index), NDII (Normalized Difference Infrared Index) и MSI (Moisture Stress Index) (Wu et al., 2009; Kior et al., 2021).

Отражение на 950–970 нм может также использоваться для оценки содержания воды в растениях, несмотря на то, что полоса поглощения света водой в этом случае ме-

нее выражена, нежели более длинноволновые полосы в области SWIR. На основании этого в работе Peñuelas et al. (1997) был предложен так называемый водный индекс (Water Index, WI), рассчитываемый на основе соотношения отражения на длинах волн 900 нм (R_{900}) и 970 нм (R_{970}) как $\frac{R_{900}}{R_{970}}$. Эти длины волн являются локальным минимумом и максимумом поглощения света водой (Peñuelas et al., 1997; Zhang, Zhou, 2019). WI является важным инструментом для мониторинга содержания воды в растениях, поскольку находится ближе к видимому диапазону света и не требует сложных и дорогих матриц у измерительных камер, которые необходимы для измерения света с длиной волны более 1000 нм (Fowler, 2014) и используются для измерения других водных индексов.

1.2.3. Пигментные индексы отражения

Растительные пигменты участвуют во многих физиологических процессах растений, выполняя энергетическую, регуляторную, рецепторную, фотопротекторную функции и др. (Demmig-Adams, 1990; Müller et al., 2001; Franklin, Quail, 2010; Kalaji et al., 2014; Ruban, 2016). Важность пигментов для растений позволяет использовать их параметры для оценки физиологического состояния растений. Кроме того, пигменты поглощают свет в видимом диапазоне, что делает относительно простым исследование их параметров при дистанционном мониторинге растений. Наиболее часто исследуемыми пигментами для мониторинга растений являются хлорофиллы а и b, каротиноиды и антоцианы.

Хлорофиллы являются основными фотосинтетическими пигментами. Их спектры поглощения включают области с сильным поглощением света в красной и синей области; при этом они несколько различаются для разных типов хлорофилла. У хлорофиллов а и b, преобладающих у высших растений, максимумы поглощения находятся на длинах волн около 438 и 668 нм и 463 и 650 нм, соответственно (Ките et al., 2018). Кроме того, важной для дистанционного мониторинга является спектральная область около 700 нм («красный край»), так как она находится на границе между значительным поглощением света хлорофиллами (длины волн менее 700 нм) и значительным отражением света (длины волн больше, чем 700 нм) (Gitelson, Merzlyak, 1996); благодаря этому, красный край очень чувствителен к концентрациям хлорофилла. Другим важным спектральным диапазоном является так называемый «зелёный край», находящийся в области 500–550

нм, который также считается чувствительным к содержанию хлорофилла в растениях. Напротив, в спектральной области около 750–900 нм (NIR) пигменты слабо поглощают свет; такой спектральный регион часто используется как референсный при расчёте индексов отражения (Gitelson, Merzlyak, 1996; Datt, 1999). Поглощение света в области зеленого края связано не только с хлорофиллами а и b, но и с каротиноидами (Gitelson, Merzlyak, 1996), что позволяет оценивать как содержание, так соотношение концентраций фотосинтетических пигментов в растениях (Huang et al., 2015). В частности, при мониторинге динамики хлорофиллов и каротиноидов широко используются такие индексы отражения, как GM1 и GM2 (Gitelson and Merzlyak Indices) (Gitelson, Merzlyak, 1996), Ctr1 и Ctr2 (Carter Indices 1 and 2) (Carter, 1994), NPCI (Normalized Pigment Chlorophyll Index) (Peñuelas et al., 1994), SIPI (Structure Intensive Pigment Index) (Penuelas et al., 1995b), PSRI (Plant Senescence Reflectance Index) (Merzlyak et al., 1999) и многие другие.

Еще одними важными пигментами растений являются антоцианы. Они выступают в качестве фотопротектора, поглощая избыточную световую энергию и нейтрализуя активные формы и кислорода и другие радикалы (Sims, Gamon, 2002; Gould, 2004). Для оценки концентрации антоцианов можно использовать жёлто-зелёную область спектра, которая соответствует максимальному поглощению света этими пигментами (Gould, 2004), в комбинации с отражением в области красного края и/или ближнего ИК, который может быть использован как референс (Gamon, Surfus, 1999; Huang et al., 2015).

Пигментные индексы широко используются для оценки содержания пигментов в растениях и активности фотосинтеза (Gitelson, Merzlyak, 1996; Huang et al., 2015). Это делает их надежными показателями возникновения стрессовых изменений у растений и перспективным инструментом для дистанционного мониторинга; в то же время, большинство пигментных индексов отражения чувствительны только к достаточно медленным изменениям состояния растений (например, изменению соотношения хлорофиллов и каротиноидов при действии неблагоприятных абиотических факторов, которое развивается в течение суток и недель).

1.2.4. Фотохимический индекс отражения

Отдельно следует рассмотреть один из наиболее подробно исследованных и перспективных индексов отражения – фотохимический индекс отражения (Photochemical Reflectance Index, PRI). Традиционно, PRI рассчитывают на основание интенсивностей отраженного света на двух длинах волн 531 нм (R_{531}) и 570 нм (R_{570}) в соответствии с формулой $\frac{R_{531} - R_{570}}{R_{531} + R_{570}}$. При этом отражение света на длине волны 531 нм может существенно снижаться при действии на растения неблагоприятных факторов; напротив, на длине волны 570 нм отражение остается приблизительно постоянным и не зависит от действия неблагоприятных факторов, что позволяет использовать эту длину волны как референсную (Gamon et al., 1992).

Снижение отражения в спектральной области около 531 нм прежде всего связывают с деэпоксидацией виолаксантина до зеаксантина в ходе ксантофиллового цикла, приводящей к изменению поглощения света в растительной ткани (Gamon et al., 1992; Filella et al., 2009). Известно, что такая деэпоксидация является важным механизмом нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла а, которая индуцируется при закислении люмена хлоропластов вследствие действия неблагоприятных факторов (в частности, избыточного освещения) (Müller et al., 2001; Ruban, 2016). На основании этого можно ожидать сильную связь PRI с активностью фотосинтетических процессов (особенно, при действии неблагоприятных абиотических факторов), что подтверждается рядом работ (Garbulsky et al., 2011; Zhang et al., 2016). Важно отметить, что изменения PRI, связанные с ксантофилловым циклом, можно считать относительно быстрыми, поскольку они развиваются в пределах от нескольких минут до нескольких десятков минут (Nilkens et al., 2010). В литературе также отмечаются сверхбыстрые изменения PRI, развивающиеся в пределах нескольких секунд и потенциально также связанные со снижением pH в люмене хлоропластов (Gamon et al., 1997; Evain et al., 2004); такое снижение приводит к быстрому сжатию хлоропластов, которое, как предполагается, и приводит к изменениям отражения света на длине волны 531 нм. Наконец, существуют медленные изменения PRI, которые связаны с изменениями содержания фотосинтетических пигментов в растениях и могут проявляться на длительных промежутках времени (от дней и недель до месяцев и сезонов (Porcar-Castell et al., 2012; Zhang et al., 2016)).

Фотохимический индекс отражения является эффективным инструментом для дистанционного мониторинга состояния растений. Его широко используют на спутниках и беспилотных летательных аппаратах (Berni et al., 2014; Garbulsky et al., 2011). Также потенциально он может быть интересен для лабораторных исследований благодаря своей

чувствительности к быстрым и медленным фотосинтетическим процессам (Zhang et al., 2016). Это делает его перспективным для развития методов оценки состояния растений (прежде всего, быстрых фотосинтетических изменений при действии неблагоприятных факторов) и создания приборов для дистанционно мониторинга отдельных растений и растительного покрова с различным временным и пространственным масштабом измерений.

1.3. Пространственная и временная неоднородность оптических свойств растений

Взаимосвязь между спектральными характеристиками растений и физиологическими, биохимическими, морфологическими показателями является одной из ключевых проблем дистанционного мониторинга. В целом, можно выделить три спектральных региона, которые связаны с составом пигментов (400-700 нм), структурой листа и кроны растений (700-1300 нм) и содержанием воды в растениях (1300-2500 нм) (Lowe et al., 2017). Как уже отмечалось выше, фотосинтетические пигменты оказывают основное влияние на отражение в видимом свете, поскольку поглощают свет в этом спектральном диапазоне (Peñuelas, Filella, 1998). Важный вклад в поглощение света пигментами вносят процессы, связанные с фотосинтезом (Gitelson, Merzlyak, 1996), а также со стрессовыми изменениями, включая диссипацию энергии и нейтрализацию продуктов окисления антоцианами (Gould, 2004) и ксантофиллами (Merzlyak et al., 1999). Смещение пиков поглощения и отражения пигментов показывает смещение баланса между процессами аккумуляции энергии во время фотосинтеза и фотосинтетического стресса (Peñuelas, Filella, 1998). Следует также отметить, что положение максимумов поглощения света растениями может быть связано с индивидуальными особенностями фотосинтетических белково-пигментных комплексов (Ките et al., 2018).

Такие процессы могут быть основой для формирования пространственной неоднородности параметров отражения листа и формирования их флуктуаций во времени, связанных с фотосинтетическими пигментами. При этом изменения отражения могут быть вызваны как быстрыми (секунды и минуты), так и медленными (дни, месяцы и сезоны) процессами.

Изменения содержания фотосинтетических пигментов связано с длительной вариабельностью растений. Известно, что состав фотосинтетических пигментов очень варь-

ирует у разных видов (Esteban et al., 2015; Kattenborn et al., 2019), зависит от индивидуального развития растений (Moorthy et al., 2008; Schlemmer et al., 2013; Ma et al., 2020) и медленно изменяется под влиянием действия факторов окружающей среды (Esteban et al., 2015). В частности, известно, что минеральное питание является важным фактором, влияющим на концентрацию фотосинтетических пигментов и ключевого фотосинтетического белка РУБИСКО, и может модифицировать оптические свойства растительной ткани (Gao et al., 2018; Wang et al., 2021). Отмеченные моменты показывают, что пространственная неоднородность видового состава, различия в возрасте растений, мелкомасштабная неоднородность в распределении питательных веществ при действии неблагоприятных факторов может порождать существенную пространственную неоднородность распределения оптических параметров растений (как на уровне участка растительного покрова, так и в рамках отдельного растения). Такая долговременная пространственная неоднородность может быть фактором, затрудняющим дистанционный мониторинг состояния растений; в то же время, она сама может быть, потенциально, использована в качестве показателя для мониторинга.

С другой стороны, факторы окружающей среды могут индуцировать кратковременные изменения поглощения света пигментами, которые могут увеличить шум сигнала из-за периодических колебаний отражения и индексов отражения. Например, флуктуации интенсивности освещения вызывают изменения фотосинтетической активности и повышение NPQ (Rascher, Nedbal, 2006; Tikkanen et al., 2012); процессы в значительной степени связаны со снижением рН люмена и являются важным защитным механизмом фотосинтеза (Müller et al., 2001; Бухов, 2004; Ruban, 2016). Учитывая активацию цикла ксантофиллов при закислении люмена (Demmig-Adams, 1990; Müller et al., 2001), которая влияет на индексы отражения (прежде всего, на PRI, Gamon et al., 1992; Filella et al., 2009), можно ожидать, что флуктуации интенсивности освещения должны приводить к увеличению временной вариабельности параметров отражения растения; в том случае, если освещение неравномерно – может также усиливаться пространственная неоднородность распределения таких параметров. Более того, быстрое возникновение пространственной неоднородности фотосинтетических процессов может происходить и при однородном изменении интенсивности освещения (например, при возникновении на свету кислых и щелочных зон у харовых водорослей, Bulychev, Komarova, 2017); можно ожидать, что такие процессы также будут сопровождаться оптической неоднородно-

стью. На форму спектрального профиля также могут влиять более медленный регуляторные процессы, модифицирующие синтез хлорофиллов (Ptushenko et al., 2020), каротиноидов (Pizarro, Stange, 2009) и антоцианов (Mancinelli, 1985).

Также известно, что регуляторные процессы, приводящие к изменению фотосинтетических процессов, могут быть связаны с распространением стрессовых сигналов, параметры которых меняются с расстоянием, и проводят к формированию быстрых и пространственно-неоднородных ответов фотосинтетических процессов (см., например, Sukhov (2016) для электрических сигналов). Известно, что влияние таких сигналов на фотосинтез может быть связано со снижением рН цитоплазмы, стромы и люмена, со входом ионов кальция или с усиленной продукцией активных форм кислорода (Sukhov, 2016). При этом закисление люмена является важным фактором модификации оптических свойств растения (см. выше). Вход Ca²⁺ в строму модифицирует в строме хлоропластов работу цикла Кальвина-Бенсона (Hochmal et al., 2015), что, в свою очередь, может привести к активации циклического потока и снижению рН в люмене хлоропластов (Joliot, Finazzi, 2010); т. е. также должно влиять на оптический свойства растительной ткани. Наконец, активные формы кислорода повреждают фотосинтетический аппарат (Ruban, 2016) и индуцируют стрессовый ответ фотосинтеза через индукцию защитных генов (Pfannschmidt et al., 2009), что, потенциально, также может модифицировать оптические свойства растительной ткани.

В целом, отмеченные быстрые процессы (например, неоднородность освещения или распространение стрессовых сигналов) могут обеспечивать, с одной стороны, быструю временную вариабельность показателей отражения у растений, а с другой стороны – выступать в качестве механизма быстрого возрастании или снижения пространственной вариабельности оптических свойств растения (или участка растительного покрова).

Различия в анатомии листьев и их пространственной ориентации также могут являться важным фактором вариабельности спектров отражения. Известно, что отражение адаксиальной стороны листа в видимом диапазоне ниже, чем отражение абаксиальной стороной; напротив в ближнем инфракрасном диапазоне отражение адаксиальной стороной выше (Ollinger, 2011; Xie et al., 2019). Этот эффект вызван различием оптических свойств палисадного и губчатого мезофилла. Известно, что палисадный мезофилл в значительной степени поглощает свет в видимом диапазоне, а губчатый мезофилл сильно рассеивает свет из-за большого числа воздушных полостей и относительно слабо его по-

глощает (Castro, Sanchez-Azofeifa, 2008). Другими важными факторами, влияющими на отражение, являются толщина листа (Knapp, Carter, 1998) и наличие волосков на поверхности листа (Lu et al., 2015). Так в толще листа в основном поглощается фотосинтетически активный синий и красный свет, в свою очередь, зеленый свет и ближнее ИК по большей части отражается (Ollinger, 2011; Kior et al., 2021). Увеличение или уменьшение толщины листа может повлиять на отражение красного и синего света; это означает, в частности, что листья разной толщины (или участки листа с разной толщиной) могут также быть источником пространственной неоднородности индексов отражения у растений.

Кроме того, ориентация листьев (Kattenborn et al., 2019) и их трепетание на ветру (You et al., 2017) могут также влиять на отражение света. Параметры листа зависят от минерального питания растений, которое влияет на их морфологию, угол наклона и структуру кроны (Ollinger, 2011).

Потенциально, различия содержания воды в растениях должно усиливать вариабельность растений и индексов отражения. Эти различия могут быть вызваны пространственной неоднородностью содержания воды в почве (Mansouri et al., 2021) и ответом растений на воздействие факторов окружающей среды.

Таким образом, вариабельность оптических параметров растений (или вариабельность между параметрами в отдельных частях одного растения), вызванная различиями в содержании пигментов, анатомических особенностях, содержании воды и др. может значительно влиять на отражение растениями света и формировать пространственную неоднородность распределения индексов отражения. Неоднородность пространственного распределения фотосинтетических показателей может быть еще одним источником неоднородности индексов отражения; при этом, можно ожидать, что действие неблагоприятных факторов может существенно влиять на такую неоднородность (вследствие разной интенсивности действия неблагоприятных факторов на различные растения или их участки, вследствие различной чувствительности растений или их участков и, возможно, вследствие распространения по растению стрессовых сигналов). Вследствие этого вариабельность пространственного распределения индексов отражения (в частности, на уровне отдельного растения или его органа, например листа) может стать дополнительным инструментом для оценки состояния растений, включая обнаружение влияния неблагоприятных факторов на растения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объект исследования

В качестве основное объекта исследований использовали 2–4-недельные растения гороха (*Pisum sativum* L., сорт Альбумен), который является важным сельскохозяйственным растением и был ранее хорошо изучен. Кроме того, в ряде экспериментов использовали дополнительные объекты: 2–4-недельные растения пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Злата) и тыквы (*Cucurbita pepo* L., сорт Мозолеевская), которые также являются важными сельскохозяйственными культурами. Известно, что спектральные характеристики отражения света могут варьировать у разных видов растений (Ustin, Gamon, 2010; Ollinger, 2011). По этой причине проверка результатов на разных объектах позволяла проверить применимость полученных результатов к различным видам растений и оценить их универсальность.

Растения выращивали в вегетационной комнате или климатической камере Binder KBW 240 (Binder GmbH, Tuttlingen, Германия) при 16/8 ч световом режиме (люминесцентные лампы) и температуре воздуха 24 °C. Растения выращивали гидропонным методом (с использованием 50% раствора Хогланда (Hoagland, Arnon 1950)), на песке или на стандартном почвенном грунте. Субстрат для выращивания растений определялся конкретными задачами исследования (см. ниже).

2.2. Индукция локального и системного действия неблагоприятных абиотических факторов на растения

В работе исследовали влияние действия на растения кратковременного водного дефицита, почвенной засухи, повышенной температуры и локального ожога; кроме того, были проведены отдельные блоки исследования по влиянию на фотохимический индекс отражения интенсивности актиничного света.

Почвенную засуху или кратковременный водный дефицит индуцировали прекращением полива, контрольные растения продолжали поливать каждые 2 дня. Таким образом в качестве первого дня засухи принимался первый день без полива. При этом, для индукции кратковременного водного дефицита растения выращивали на песчаном субстрате, которые обеспечивал быструю потерю воды (в пределах нескольких дней после прекращения полива). Такая экспериментальная модель засухи обеспечивала быстрые и массовые исследования и была эффективна для фундаментальных исследований меха-

низмов изменений индексов отражения, анализа эффективности их применения для оценки состояния растений, а также для первичного поиска новых индексов отражения; однако, она в меньшей степени соответствовала полевым условиям. Для индукции почвенной засухи растения выращивали на почве; в этих условиях потеря воды происходила значительно медленнее и длительность засухи могла доходить до 2-3-х недель. Такая модель в максимальной степени соответствовала засухе в условиях открытого грунта и использовалась для дополнительной проверки новых выявленных индексов отражения. Полив контрольных растений осуществлялся в стандартном режиме. Измерения параметров отражения и фотосинтеза осуществляли у опытных и контрольных растений либо каждый день (кратковременный водные дефицит), либо через день (почвенная засуха).

Для исследования теплового воздействия на растения их нагревали в термостате TV-20-PZ-"K" (Касимовский приборный завод, Россия) в течение 30 минут при температуре 46.5°С. В этой группы исследований использовали растения, выращенные на гидропонике, так как такая схема эксперимента обеспечивала одинаковое количество водного раствора у растений и позволяла дополнительно стандартизировать их нагрев. Измерения спектров отражения и параметров фотосинтеза для каждого растения проводились через 1 час и 1 день после окончания нагревания растений.

В качестве локального повреждающего воздействия использовали локальный ожог, так как такой ожог является стандартными индуктором распространения электрических сигналов (вариабельного потенциала, ВП) и последующего развития системного фотосинтетического ответа растения (Sukhov, 2016). В ходе эксперимента растения адаптировали в течение 75 минут перед нанесением ожога и индукцией электрического сигнала (15 мин темновой адаптации и 60 минут адаптации при освещении актиничным светом). Ожог наносили открытым пламенем на листовую пластинку первого зрелого листа (длительность 3–4 с, площадь ожога около 1 см²).

Измерения потенциала, позволяющие оценить параметры распространения электрических сигналов, проводили экстраклеточно с помощью AgCl электродов (EVL-1M3.1, Гомельский приборный завод, Беларусь), высокоимпедансного усилителя (ИПЛ-113, Семико, Россия) и ПК. Электроды располагались на листовых пластинках второго и четвертого листа и на стебле вблизи них. Электропроводящий гель Uniagel (Гельтек-

Медика, Россия) использовали для соединения электродов и растения в едину электрическую цепь. Электрод сравнения располагался в растворе, омывающем корни.

В этом блоке исследований использовали растений выращенные на гидропонике, так как такой метод выращивания облегчал перенос растения в экспериментальную установку для измерения электрических сигналов.

2.3. Измерения фотосинтетической активности с использованием РАМфлуориметра и инфракрасного газоанализатора

В экспериментах измеряли активность фотосинтеза, при этом использовали различные приборы для точечного и пространственного измерения. Также использовали комбинации нескольких блоков приборов для одновременной регистрации параметров отражения и фотосинтетической активности растений.

(1) Интегральная оценка параметров фотосинтеза на участке листа в лабораторных условиях проводилось одновременно с измерением спектра отражения такого участка, как показано на Рис.2.1; такая схема использовалась в большинстве экспериментальных вариантов. Активность фотосинтеза оценивали с помощью флуориметра Dual-PAM-100 (Heinz Walz GmbH, Германия). Растения адаптировали в темноте в течение 15 минут. Далее в конце темновой адаптации генерировался первый насыщающий импульс SP (630 нм, 10 000 µмоль м⁻² с⁻¹, 300 мс) и измерялся темновой (F₀) и максимальный (Fm) уровень флуоресценции. Максимальный квантовый выход фотохимических реакций фотосистемы II рассчитывали по формуле (2.1) (здесь и далее формулы для параметров фотосинтеза взяты из Maxwell, Johnson, 2000; Sukhov et al., 2015):

$$Fv/Fm = \frac{Fm - F_0}{Fm} \quad (2.1)$$

После темновой адаптации включался актиничный свет (AL), для чего была использована белая галогеновая лампа (Osram Decostar, 3000K, 20 W, 12 V, Германия) с интенсивностью падающего на лист света 630 µмоль M^{-2} с⁻¹ или собственные светодиодные источники актиничного света Dual-PAM-100 (синий с максимумом на 460 нм или красный с максимумом на 630 нм, интенсивность освещения варьировала).



Рис.2.1. Схема одновременного измерения фотосинтетических параметров с помощью Dual-PAM-100 и отражения света листьями растения с помощью спектрометра S100. Dual-DB – детектор; Dual-E – эмиттер; AL – актиничный свет PAM; ML – измерительный свет PAM; SP – насыщающие вспышки PAM; RL – отраженный свет. В качестве источника освещения использовалась либо белая галогеновая лампа (в этом случае источник освещения служил одновременно источником актиничного и измерительного света), либо источник желто-зеленого измерительного света (в этом случае в качестве источника актиничного света использовались собственные светодиоды Dual-PAM-100).

На фоне актиничного света каждые 30 с генерировались насыщающие вспышки SP; измерение стационарного (F) и максимального (Fm') уровня флуоресценции проводилось во время генерации каждого SP. Эффективный квантовый выход фотохимических реакций фотосистемы II рассчитывали на основании уравнения (2.2):

$$YII = \frac{Fm - F}{Fm} \quad (2.2)$$

Нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла а рассчитывали на основании уравнения (2.3):

$$NPQ = \frac{Fm - Fm}{Fm} \quad (2.3).$$

Быстро-релаксирующую компоненту нефотохимического тушения рассчитывали в соответствии с уравнением (2.4):

$$NPQ_F = \frac{Fm}{Fm^{\ L}} - \frac{Fm}{Fm^{\ DR}}$$
(2.4)

где Fm^{'L} – максимальная флуоресценция, измеренная во время последнего SP перед выключением актиничного света; Fm^{'DR} – максимальная флуоресценция, измеренная во время генерации SP в конце быстрой темновой релаксации флуоресценции (2 минуты).

Коэффициент фотохимического тушения рассчитывали в соответствии с уравнением (2.5):

$$qP = \frac{Fm - F}{Fm - F_0} \quad (2.5)$$

где *F*₀ – минимальный уровень флуоресценции фотосистемы II после предварительной световой адаптации растения, который рассчитывали в соответствии с уравнением (2.6):

$$\vec{F_0} = \frac{F_0}{\frac{Fm - F_0}{Fm} + \frac{F_0}{Fm}}$$
(2.6)

Линейный поток электронов рассчитывали в соответствии с уравнением (2.7):

$$LEF = p \cdot dII \cdot YII \cdot PAR \quad (2.7),$$

где р – коэффициент эффективности поглощения падающего на растения света хлорофиллом (0.88 для гороха, Sukhov et al., 2015); dII – доля световой энергии, которая пошла на фотосистему II (0.42 для гороха, Sukhov et al., 2015).

Квантовый выход фотохимических реакций фотосистемы I рассчитывали в соответствии с уравнением (2.8):

$$YI = \frac{Pm - P}{Pm} \quad (2.8),$$

где Pm – максимальный уровень Р₇₀₀-сигнала фотосистемы I у адаптированного к темноте растения; *Pm* – максимальный уровень Р₇₀₀-сигнала фотосистемы I у адаптированного к свету растения; P – текущий уровень Р₇₀₀-сигнала фотосистемы I.

Квантовый выход потерь фотосистемы I в связи с ограничениями донорной стороны рассчитывали в соответствии с уравнением (2.9):

$$YND = \frac{P}{Pm} \quad (2.9)$$

Квантовый выход потерь фотосистемы I в связи с ограничениями акцепторной стороны рассчитывали в соответствии с уравнением (2.10):

$$YNA = \frac{Pm - Pm}{Pm} \quad (2.10).$$

При построении световых кривых фотосинтетических параметров и индексов отражения, лист растения последовательно освещали актиничным светом с возрастающей интенсивностью (5 мин); периоды освещения были разделены периодами темновой релаксации (2 мин), в течение которых актиничный свет отсутствовал.

(2) Для оценки эффективности системы PRI-имиджинга, которая была разработана совместно с ИПФ РАН, измерения фотохимического индекса отражения осуществляли параллельно с измерением показателей фотосинтеза у нескольких растений. Показатели фотосинтеза измеряли с использованием системы PAM-имиджинга Open FluorCam FC 800-O/1010 (Photon Systems Instruments, Чехия). Растения адаптировали в течение 15 минут, а в конце темновой адаптации генерировали импульс насыщающего света (4000 µмоль м⁻² c⁻¹, холодный белый цвет, 6500 К). Далее SP генерировались каждую минуту на фоне красно-оранжевого актиничного света (617 нм).

При исследовании влияния освещения на фотосинтез и PRI, растения последовательно освещали актиничным светом разной интенсивности по следующей схеме: 70 µмоль $M^{-2} c^{-1} AL$ и периодические SP в течение 5 минут – периодические SP без AL в течение 5 минут – 140 µмоль $M^{-2} c^{-1} AL$ и периодические SP в течение 5 минут – периодические SP без AL в течение 5 минут – 210 µмоль $M^{-2} c^{-1} AL$ и периодические SP в течение 5 минут – периодические SP без AL в течение 5 минут – периоические SP без AL в течение 5 минут – 210 µмоль $M^{-2} c^{-1} AL$ и периодические SP в течение 5 минут – периодические SP без AL в течение 5 минут – 280 µмоль $M^{-2} c^{-1} AL$ и периодические SP в течение 5 минут – периодические SP без AL в течение 5 минут. Влияние водного дефицита и температурного шока исследовали с использованием периодических SP и AL=280 µмоль $M^{-2} c^{-1}$ в течение 10 минут с последующим режимом периодических SP без AL в течение 5 минут. Далее на основе полученных результатов рассчитывали NPQ_F (в соответствии с уравнением (2.4)).

(3) Для верификации разработанной математической модели фотосинтетической активности листа требовалось исследование пространственного распределения активности фотосинтетических процессов у листа гороха, которое проводили с использованием РАМ-имиджинга IMAGING-PAM M-Series MINI Version (Heinz Walz GmbH, Германия). Растения предварительно адаптировали в темноте в течение 15 минут. После этого были измерены уровни темновой (F₀) и максимальной (Fm) флуоресценции. Далее последовательно включали ступени света длительностью 10 минут для интенсивностей 42, 110, 221, 491 и 996 µмоль м⁻² с⁻¹. Стационарный и максимальный выходы флуоресценции на

свету измеряли после включения насыщающих вспышек, генерируемых каждую минуту. Далее рассчитывали YII (уравнение (2.2)) и LEF (уравнение (2.7)).

(4) Для оценки фотосинтетической ассимиляции углекислого газа (A_{hv}) и проводимости устьиц (gs) использовали инфракрасный газоанализатор GFS-3000 (Heinz Walz GmbH, Германия). Содержание CO₂ в кювете газоанализатора составляло 360 ppm, содержание воды - 20000 ppm, температура равнялась 23°C. gs рассчитывался автоматический с использованием ПО газоанализатора, A_{hv} рассчитывали, как разность ассимиляции CO₂ (A) в условиях действия актиничного света и без него. Для обеспечения светового режима измерений и одновременного анализа параметров световой стадии фотосинтеза GFS-3000 использовали в комбинации с Dual-PAM-100 или с IMAGING-PAM M-Series MINI Version.

2.4. Оценка закисления люмена на основании измерения светорассеяния на 535 нм листьями растений

В отдельной серии экспериментов для исследования связи между изменениями фотохимического индекса отражения и сдвигами pH люмена были выполнены измерения light scattering на 535 нм (LS), которое определялось стандартным методом по светопропусканию листа на 535 нм (Schreiber, Klughammer, 2008). Такой метод широко используется для полуколичественной оценки pH люмена; увеличение LS является показателем закисления люмена хлоропластов (Schreiber, Klughammer, 2008).

Для измерения использовалась система, аналогичная представленной на рисунке 2.1, которая включала спектрометр и систему Dual-PAM-100, оснащенную стандартным дополнительным модулем, включающим в себя эмиттер желтого измерительного света Dual-EP515 и детектор для измерения пропускания такого света Dual-DP515 (Walz Gmb, Германия). Дополнительный источник освещения растений (на Puc.2.1 справа) в этом варианте эксперимента не использовали. Эмиттер-детекторный модуль включал два источника слабого измерительного света – с максимумом на 535 нм и с максимумами на 515 и 550 нм; в исследовании применяли только измерения на 535 нм.

Перед измерениями растения адаптировали в темноте в течение 10 мин, абсорбцию света регистрировали, начиная с последней минуты темновой адаптации. Далее включали красный актиничным светом (630 нм) с интенсивностью 1036 µмоль м⁻² с⁻¹, время освещения составило 10 мин. За нулевой уровень LS принимали уровень первой

временной точки после начала освещения, усредненный в интервале 5-10 с. Далее временные точки оценивали с минутным интервалом.

2.5. Измерение спектральных характеристик отраженного света у растений и основные методы исследования индексов отражения

В зависимость от задачи, в экспериментах по измерению спектральных характеристик отраженного света растений использовали три прибора, включая спектрометр, гиперспектральную камеру и разработанную систему PRI-имиджинга.

(1) В ряде экспериментов спектры отражения измеряли интегрально с участка листа при помощи спектрометра S100 (SOLAR Laser Systems, Беларусь). В большинстве подобных экспериментов производилась одновременная регистрация спектров отражения и параметров фотосинтеза, что позволяло более точно сопоставлять исследуемые показатели (Puc.2.1).

Спектральный диапазон S100 включал длины волн от 190 до 1050 нм, спектральное разрешение около 1 нм. Время интеграции составляло 5 с. Расстояние между листом растения и коллиматором составляло около 1.5 см, угол примерно 30°. В качестве калибровочного стандарта использовали серую 18% калибровочную карту (QPcard Calibration Card v3, Argraph Corp., Carlstadt, USA). Расстояние между растением и источником света или GYL (жёлто-зелёных импульсов света) составляло 15 см, угол примерно 30° (Рис.2.1).

В ряде экспериментальных вариантов (комплексное исследование локального и системного действия неблагоприятных факторов на индексы отражения растения, исследование влияния локального ожога и электрических сигналов на PRI) растения освещали белой галогеновой лампой, являющейся источником актиничного света (см. предыдущий раздел); отраженный свет использовали для измерения спектральных характеристик отраженного света. Преимуществом такого источника являлась возможность измерения отраженного света в широком спектральном диапазоне.

Другие экспериментальные варианты (исследование световых зависимостей фотохимического индекса отражения при различной интенсивности актиничного света) опирались на использование источника желто-зеленого измерительного света (GYL). Источник GYL включал в себя LED лампу белого света TDS-P003L4U14 LED (TDS Lighting Co., Ltd., Jiangsu, Китай), оснащенную жёлтым (Y-1,4x) и жёлто-зелёный (YG-

2x) фильтрами, интенсивность света составляла 240 μ mol м⁻² с⁻¹ в зоне освещения листа. В соответствии с предложенным в ходе выполнения диссертационного исследования методом, растительный объект освещали импульсами GYL В этой группе экспериментальных вариантов длительность импульсов GYL составляла 30 с, импульсы генерировались каждую минуту и выключались за 5 с до генерации насыщающих вспышек SP Dual-PAM-100. Интенсивность отраженного света перед импульсом GYL и интенсивность во время импульса GYL измерялись для каждой исследуемой длины волны. После этого рассчитывалась разность таких интенсивностей; полученную величину использовали при анализе (см. главу 4).

При комплексном исследовании индексов отражения, для которого были использованы результаты, полученные при освещении белой галогеновой лампой, рассчитывались все возможные нормализованные разностные индексы отражения RI(λ1, λ2). Для этого использовали уравнение (2.11):

$$RI(\lambda 1, \lambda 2) = \frac{R_{\lambda 1} - R_{\lambda 2} \frac{R_{\lambda 1}^{Cal}}{R_{\lambda 2}^{Cal}}}{R_{\lambda 1} + R_{\lambda 2} \frac{R_{\lambda 1}^{Cal}}{R_{\lambda 2}^{Cal}}}$$
(2.11),

где $R_{\lambda 1}$ и $R_{\lambda 2}$ – интенсивность света, отраженного листом растения на длинах волн $\lambda 1$ и $\lambda 2$, соответственно, $R_{\lambda 1}^{Cal}$ и $R_{\lambda 2}^{Cal}$ – интенсивность света, отраженного калибровочным стандартом на длинах волн $\lambda 1$ и $\lambda 2$, соответственно. При этом, в ходе комплексного исследования были изучены все возможные сочетания $\lambda 1$ и $\lambda 2$ в рамках измеренного спектра видимого света (400–700 нм); для повышения точности измерения и их сопоставления с измерениями на гиперспектральной камере (см. ниже) полученные интенсивности отраженного света усредняли с шагом 3 нм.

Для первичного расчета всех возможных индексов отражения и их последующего комплексного исследования были разработаны программные инструменты на языке Python 3.8. Программные инструменты рассчитывали все возможные нормализованные индексы отражения в диапазоне 400–700 нм в соответствии с уравнением (2.11), определяли статистическую значимость различий между опытом и контролем и далее строили тепловые карты для достоверности различий. По координатам тепловых карты откладывались величины $\lambda 1$ (ось абсцисс) и $\lambda 2$ (ось ординат); псевдоцвета показывали области со статистически значимыми различиями и направления изменения индекса по сравне-

нию с контролем. Поскольку верхний угол тепловой карты дублировал её нижний угол, то верхний угол удаляли с помощью условия о том, что расчёты не производились, если $\lambda 2 \ge \lambda 1$. Подобный метод позволял объединить информацию по всему массиву рассчитанных индексов отражения в единое компактное изображение.

Учитывая, что изменения индексов могут оказаться более эффективными показателями, нежели их величины, аналогичная процедура приводилась не только для величин самих индексов, но также для величин их изменений. При этом, в случае исследования системно действующих стрессоров (кратковременный водный дефицит, нагрев) для анализа использовали светоиндуцированные изменения $RI(\lambda 1, \lambda 2)$, которые рассчитывали как разность между величинами индексов после 7 минут освещения и в начальный момент освещения. В случае действия локального стрессора (ожог) и распространения электрических сигналов, использовались величины изменения $RI(\lambda 1, \lambda 2)$ по сравнению с его величиной перед ожогом. Расчеты изменений также осуществлялись с использованием разработанных программных инструментов.

При комплексном исследовании результатов, полученных с использованием спектрометра на фиксированных в пространстве листьях растений, было показано, что распределения некоторых индексов не соответствуют нормальному распределению. В связи с этим, для упрощения и унификации комплексного анализа были использованы непараметрические методы статистического анализа (определялись медианы, достоверность различий оценивали с использованием критерия Манн-Уитни U-теста).

Помимо комплексного исследования в работе осуществлялось также исследование отдельных индексов отражения, показывающих наиболее выраженные изменения при действии стрессоров. В рамках такого исследования оценивали корреляции Пирсона полученных индексов с максимальным квантовым выходом фотохимических реакций фотосистемы II и с относительным содержанием воды в условиях кратковременного водного дефицита.

В различных вариантах экспериментов, посвященных исследованию фотохимического индекса отражения и его модификацией использовали либо вариант освещения белой галогеновой лампой, либо вариант с использованием импульсов желто-зеленого измерительного света (GYL). Типичный фотохимический индекс отражения рассчитывался на основании двух длин волн: 531 и 570 нм (Gamon et al., 1992):
$$RI(531,570) = \frac{R_{531} - R_{570} \frac{R_{531}^{Cal}}{R_{570}^{Cal}}}{R_{531} + R_{570} \frac{R_{531}^{Cal}}{R_{570}^{Cal}}}$$
(2.12),

где R_{531} – интенсивность света, отраженного листьями растения на длине волны 531 нм; R_{570} – интенсивность света, отраженного листьями растения на длине волны 570 нм, R_{531}^{Cal} – интенсивность света, отраженного калибровочным стандартом на длине волны 531 нм; R_{570}^{Cal} – интенсивность света, отраженного калибровочным стандартом на длине волны 531 нм; R_{570}^{Cal} – интенсивность света, отраженного калибровочным стандартом на длине волны 531 нм; R_{570}^{Cal} – интенсивность света, отраженного калибровочным стандартом на длине волны 570 нм.

Также отдельно исследовали модифицированные фотохимические индексы отражения, которые рассчитывали как:

$$RI(m,570) = \frac{R_m - R_{570} \frac{R_m^{Cal}}{R_{570}^{Cal}}}{R_m + R_{570} \frac{R_m^{Cal}}{R_{570}^{Cal}}} \quad (2.13),$$

где R_m - интенсивность света, отраженного листьями растения на длине волны m, равной 515, 525, 535, 545 и 555 нм для различных модифицированных индексов отражения, индекс «Cal» - отражение света калибровочным стандартом.

В работе исследовали не только абсолютные величины фотохимического индекса отражения и его модификаций, но также изменения таких индексов. При использовании белой галогеновой лампы расчет таких изменений полностью соответствовал расчету, описанному выше для произвольного индекса отражения. При использовании измерительных импульсов GYL, для оценки светоиндуцированных изменений использовали разность между величиной индекса на момент перед окончанием освещения каждой интенсивностью света (5 мин) и величиной индекса в условиях отсутствия актиничного света перед началом первого периода освещения в эксперименте (начальной величиной фотохимического индекса отражения или его модификации).

(2) В сериях экспериментов, направленных на исследование параметров отражения растительного покрова (в качестве экспериментальной модели растительного покрова были использованы подносы, плотно заполненные вегетационными сосудами с растениями) использовали гиперспектральную камеру Specim IQ (Specim, Spectral Imaging Ltd, Финляндия). Такая камера имеет спектральный диапазон 400–1000 нм, спектральное разрешение около 3 нм, матрицу – 0.2 мегапикселя. Спектр отражения калибровочного стандарта, входящего в комплект камеры, использовался для нормализации отражения и введения поправки на источник света. Камера располагалась над растениями под углом 90° на расстоянии около 1 м. Полученные данные представляли собой гиперкуб, состоящий из слоев. Каждый из слоев являлся изображением объекта на соответствующей длине волны.

Данные гиперкуба обрабатывали с помощью разработанных программных инструментов на языке Python 3.8 с использованием библиотек spectral и numpy. Отражение на длинах волн R₁ и R₂ записывалось в массивы. Далее на основе массивов для R₁ и R₂ рассчитывали массивы индексов отражения RI(λ 1, λ 2) (в соответствии с уравнением (2.11) но без дополнительной поправки на калибровочный стандарт, которая осуществлялась автоматически ПО камеры). Для исключения фона были использованы специальные маски, вырезающие значения индексов отражения на участках, соответствующих почве, калибровочному стандарту или стенкам вегетационных сосудов. Пример применения таких масок для гороха и пшеницы в лабораторных условиях показан на рисунке 2.2. Для построения масок были использованы коэффициенты отражения на длинах волн 543 нм (для коэффициента отражения на этой длине волны вводился минимальный порог) и 661 нм (для коэффициента отражения на этой длине волны вводился максимальный порог); выбранные длины волн были оптимальны для выявления фотосинтезирующей ткани растения по сравнению с фоном измерения.

Дальнейший анализ полученного массива индексов отражения растительного покрова соответствовал аналогичному комплексному исследованию фиксированных в пространстве листьев, которое было описано в предыдущем разделе. Однако, в этом варианте исследования были использованы методы параметрической статистики (определение среднего и стандартного отклонения среднего, применение т-теста Стьюдента). Это было возможно в связи со значительным числом повторов в этом варианте эксперимента (n = 45), что позволяло использовать параметрические методы в соответствии с центральной предельной теоремой.

Помимо комплексного анализа результатов, разработанные программные инструменты позволяли получать значения конкретных индексов отражения с наибольшей эффективностью, которые далее использовали для оценки динамики изменений.



(B)



Рис.2.2. Примеры первичной обработки гиперспектральных изображений растительного покрова условиях. (а) RGB изображение гороха; (б) псевдоцветовое изображение нормализованного индекса RI(613, 605) гороха после использования маски, исключающей фон; (в) RGB изображение пшеницы; (г) псевдоцветовое изображение нормализованного индекса RI(613, 605) пшеницы после использования маски, исключающей фон.

(3) В ряде экспериментов (исследование влияние интенсивности освещения, водного дефицита и нагрева на PRI) была использована система для измерения пространфотохимического отражения PRIственного распределения индекса (система имиджинга), разработанная совместно с коллективом ИПФ РАН. Поскольку разработка и апробация системы является частью диссертационной работы, то ее подробное описание представлено в Результатах, Глава 4. В системе использовали предложенный метод применения импульсов желто-зеленого измерительного света, повышающий точность регистрации фотохимического индекса отражения и минимизирующий влияние фонового освещения из других источников. Камера регистрировала отражение света на фоне GYL и без него, далее ПО системы рассчитывало разность отражений в условиях этих

вариантов освещения. Такая процедура осуществлялась для отражения при 531 и 570 нм; результаты использовали для расчета фотохимического индекса отражения в соответствии с уравнением (2.12). При апробации системы измерения осуществляли на фиксированных в плоскости измерения листьях растений совместно с РАМ-имиджинга Open FluorCam FC 800-O/1010. Камера располагалась под углом 45° по отношению к растениям. Светоиндуцированные изменения PRI рассчитывали как разность между величиной PRI в конце периода освещения конкретной интенсивностью актиничного света (5 мин) и «темновой» величиной PRI перед началом измерения световой кривой.

2.6. Измерение содержания воды в побегах растений

Относительное содержание воды оценивалось стандартным методом на основе сырого и сухого веса растений. Побеги растений взвешивали, а затем высушивали в термостате TV-20-PZ-"K" (Kasimov Instrument Plant, Россия) (2 ч, 100°С). Далее побеги повторно взвешивали. Содержание воды рассчитывали по следующей формуле:

$$RWC = \frac{m_F - m_D}{m_F} \cdot 100\% \tag{2.14},$$

где RWC – относительное содержание воды в побегах растений, m_F – сырая масса побегов, m_D – сухая масса побегов.

2.7. Математическое моделирование фотосинтетической активности листа Общее описание модели и ее блоков

Для исследования пространственной неоднородности фотосинтетической активности была разработана модель плоского круглого листа (Рис. 2.3). Было принято, что моделируемый лист представляет собой двумерную систему кубических клеток, связанных с апопластом. Внутри клеток находилась цитоплазма и хлоропласты. Объем, занимаемый вакуолью, исключался из внутреннего объема клеток. Модель включала в себя описание следующих смысловых блоков:

- ионный транспорт, включая модели систем трансмембранного ионного транспорта, описание латеральной диффузии, изменений концентрации и буферных свойств;

транспорт углекислого газа через устьица и по внутреннему пространству листа;
ассимиляция углекислого газа в процессе фотосинтеза.



Рис. 2.3. Схема математической модели, включающая (а) двумерный плоский лист, (б) транспорт ионов и углекислого газа по компартментам, (в) модель ассимиляции углекислого газа на основе модели Farquhar – von Caemmerer – Berry (Farquhar et al., 1980; von Caemmerer et al., 2009) и (г) рассматриваемые с помощью модели варианты плотности распределения устьиц по листу.

Ионный транспорт через плазматическую мембрану

В модель было включено описание ионного транспорта через плазматическую мембрану клеток. Для простоты рассматривались минимальная система, состоящая из H⁺-АТФазы, K⁺-каналов и K⁺/H⁺-антипорта, которые необходимы для описания потенциала покоя и изменений концентраций калия и протонов в цитоплазме и апопласте.

Цикл работы H⁺-АТФазы был описан на основе модели two-state, описывающая активный перенос протона через мембрану против электрохимического градиента за счет энергии АТФ (Hansen et al., 1981; Sukhov et al., 2009):

$$J_{H^{+}-ATPase} = A_{ATP} A_{BL} \frac{k_{+1}k_{+2}-k_{-1}k_{-2}}{k_{+1}+k_{+2}+k_{-1}+k_{-2}} \quad (2.15),$$

где J_{H+-ATPase} – поток протонов через H⁺-ATФазу; к₊₁ и к₋₁– константы скорости связывания и распада H⁺-ATP-азы с ионом с внутренней стороны мембраны при ATФзависимом переносе протонов через мембрану; к₊₂ и к₋₂ – константа скорости распада и связывания иона и H⁺-ATP-азы при потенциал-зависимом переносе протонов через мембрану. Константы скорости были описаны следующими уравнениями:

$$k_{+1} = k_1 H_{in}, \quad k_{-1} = k_1 exp\left(\frac{-G}{RT}\right), \quad k_{+2} = \frac{k_2 u}{1 - exp\left(-u\right)}, \quad k_{-2} = \frac{k_2 u H_{out} exp\left(-u\right)}{1 - exp\left(-u\right)} \quad (2.16),$$

где к₁ и к₂ – константы скорости при u=0 и концентрациях протонов по обе стороны мембраны 1 М; H_{in} и H_{out} – концентрации протонов в цитоплазме и апопласте; G – энергия гидролиза АТФ; R – газовая постоянная, T – абсолютная температура; u=E_m·F/(R·T) – нормализованный мембранный потенциал, F – постоянная Фарадея.

Дополнительно была описана регуляция Н⁺-АТФазы синим светом и зависимость от содержания АТФ в клетках (Kinoshita, Shimazaki, 1999):

$$A_{ATP} = \frac{K_{cyt}ATP}{K_{ATP} + ATP},$$

$$A_{BL} = \frac{A_{BL0}BL}{BL + K_{BL}} + \frac{Light}{Light + BL}, \quad (2.17),$$

где A_{ATP} – активность H⁺-АТФазы при текущей концентрации ATФ; ATP – концентрация ATФ; K_{cyt} – коэффициент пропорциональности между ATФ для листа и ATФ в цитоплазме; K_{ATP} – константа, равная концентрации ATФ, при которой активность H⁺-ATФазы равна 0.5; A_{BL} – активность H⁺-ATФазы при текущей интенсивности синего света Light; A_{BL0} – активность H⁺-ATФазы, в условиях, когда интенсивность синего света равна 0; BL – интенсивность синего света, при которой активность H⁺-ATФазы равна 0.5.

Поток ионов через калиевые гиперполяризационные (J_{kg}) и деполяризационные (J_{kd}) каналы описывали уравнением Гольдмана-Ходжкина-Катца (Gradmann, 2001):

$$J_{kg} = \frac{P_{kg}P_{max}u(K_{in} - K_{out}exp(-u))}{1 - exp(-u)}, J_{kd} = \frac{P_{kd}P_{max}u(K_{in} - K_{out}exp(-u))}{1 - exp(-u)} \quad (2.18),$$

где P_{max} – максимальная проводимость деполяризационных и гиперполяризационных калиевых каналов; P_{kg} и P_{kd} – вероятности открытия гиперполяризационных и деполяризационных калиевых каналов, которые описывали уравнением (2.19) (Sukhov, Vodeneev, 2009).

$$P_{kg} = \frac{1}{1 + exp(c_{kg}(u - u_{kg}))}, P_{kd} = \frac{1}{1 + exp(c_{kd}(u_{kd} - u))} \quad (2.19)$$

где u_{kg} и u_{kd} – нормализованные потенциальные барьеры для перехода гиперполяризационных и деполяризационных каналов из закрытого состояния в открытое и обратно; c_{kg} и c_{kd} – коэффициенты пропорциональности действия потенциала на мембране на воротный механизм гиперполяризационных и деполяризационных каналов.

Поток ионов через электронейтральный К⁺/H⁺-антипортер (J_{ant}) описывали следующим уравнением (Sukhov, Vodeneev, 2009):

$$J_{ant} = ant(K_{in}H_{out} - K_{out}H_{in}) \quad (2.20),$$

где ant – скорость работы К⁺/Н⁺-антипортера.

Мембранный потенциал описывали стационарно следующим уравнением:

$$E_m = \frac{g_K E_K + g_H E_H}{g_K + g_H} \quad (2.21),$$

где E_K и E_H – потенциалы Нернста, при которых потоки через калиевые каналы и H⁺-АТФазу, соответственно, равны нулю; g_K и g_H – проводимости калиевых каналов и H⁺-АТФазы. Потенциалы Нернста для калия и протонов описывали следующим уравнением:

$$E_{K} = \frac{-RT}{F} ln\left(\frac{K_{in}}{K_{out}}\right), \quad E_{H} = \frac{-RT}{F} ln\left(\frac{H_{in}}{H_{out}}\right) - \frac{G}{F} \quad (2.22)$$

Проводимость плазмалеммы для калия и протонов описывалась следующими уравнениями:

$$g_K = \frac{F(J_{kg} + J_{kd})}{E_m - E_K}, \quad g_H = \frac{FJ_{H^+ - ATPase}}{E_m - E_H}$$
 (2.23).

Описание буферных свойств апопласта и цитоплазмы

В модели были описаны буферные свойства цитоплазмы и апопласта. При этом для калия в цитоплазме считалось, что буфер не влияет на его концентрацию, а для описания буфера протонов использовалось стационарное решение как в работе Сухов, Воденеев (2005):

$$H_{in} = \frac{\left(H_{in}^{\Sigma} - B_{in}^{\Sigma} - \kappa_{H}\right)}{2} + \frac{\sqrt{\left(H_{in}^{\Sigma} - B_{in}^{\Sigma} - \kappa_{H}\right)^{2} + 4\kappa_{H}H_{in}^{\Sigma}}}{2} \qquad (2.24)$$

где H_{in} – концентрация свободных протонов в цитоплазме; H_{in}^{Σ} - суммарная концентрация свободных и связанных протонов в цитоплазме; B_{in}^{Σ} - суммарная концентрация буфера протонов в цитоплазме; K_{Hin} – константа равновесия для связывания протонов буфером.

Для описания буфера апопласта была принята модель конкурентного связывания ионов калия и протонов с буфером апопласта:

$$BK \stackrel{k_{K+}K^+}{\underset{k_{K-}}{\overset{k_{K-}}{\longrightarrow}}} B_{out} \stackrel{k_{H-}}{\underset{k_{H+}H^+}{\overset{k_{H-}}{\longrightarrow}}} BH$$

Для нахождения стационарного решения были приняты следующие допущения:

$$H_{out}^{\Sigma} - H_{out} \approx H_{out}^{\Sigma}, \quad \frac{K_{out}}{H_{out}} = \frac{K_K (K_{out}^{\Sigma} - K_{out})}{K_H (H_{out}^{\Sigma} - H_{out})} \approx \frac{K_K (K_{out}^{\Sigma} - K_{out})}{K_H H_{out}^{\Sigma}}$$

где H_{out} и K_{out} – концентрации свободных форм калия и протонов в апопласте, соответственно; B_{out}^{Σ} - суммарная концентрация буфера в апопласте; H_{out}^{Σ} - суммарная концентрация свободных и связанных протонов в апопласте; K_{out}^{Σ} - суммарная концентрация свободных и связанных форм калия в апопласте; K_H и K_K – константы равновесия для связывания буфером апопласта протонов и ионов калия, соответственно.

Стационарное решение выглядело следующим образом:

$$H_{out} = \frac{-\kappa_H H_{out}^{\Sigma} \left(B_{out}^{\Sigma} - H_{out}^{\Sigma} - \kappa_{out}^{\Sigma} - \kappa_K\right)}{2\kappa_K \left(B_{out}^{\Sigma} - H_{out}^{\Sigma}\right)} + \frac{\sqrt{\left(\kappa_H H_{out}^{\Sigma} \left(B_{out}^{\Sigma} - H_{out}^{\Sigma} - \kappa_{out}^{\Sigma} - \kappa_K\right)\right)^2 + 4\kappa_K \kappa_H^2 H_{out}^2 \left(B_{out}^{\Sigma} - H_{out}^{\Sigma}\right)}}{2\kappa_K \left(B_{out}^{\Sigma} - H_{out}^{\Sigma}\right)}$$

$$K_{out} = \frac{K_K H_{out} K_{out}^{\Sigma}}{K_H H_{out}^{\Sigma} + K_K H_{out}} \quad (2.25).$$

Описание транспирации и проводимости устьиц

Проводимость устьиц листа растения (g_s) была описана с помощью гидромеханической модели, представленной в работе (Gao et al., 2002):

$$g_s = \frac{\varphi_s - \pi}{\beta} / \left(1 + \frac{v_{pd}}{\beta g_z} \right) \quad (2.26),$$

где φ_s – водный потенциал почвы; π – осмотический потенциал в устьичных клетках; β – механические свойства устьиц; g_z –проводимость для воды между почвой и устьицами; vpd – содержание воды в атмосфере. При необходимости заданной модификации проводимости устьиц g_s умножали на соответствующий поправочный коэффициент, что позволяло упрощенно проанализировать влияние проводимость устьиц на исследуемые показатели.

Транспирация описывали следующим уравнением:

$$T = g_s vpd \quad (2.27).$$

Проводимость устьиц для CO₂ (g_{CO2}) считалась пропорциональной проводимости для воды в соответствие с работой (Cabrera et al., 2021):

$$g_{CO_2} = \frac{g_s}{1.6}$$
 (2.28).

Описание диффузии калия, протонов и CO₂/HCO₃⁻

В модели была описана диффузия ионов калия, протонов и поступившего через устьица углекислого газа по межклеточному пространству – апопласту:

$$\frac{dr}{dt} = aD(r_1 - r_2) \quad (2.29),$$

где r – ионы H⁺ и K⁺, CO₂ и HCO₃⁻; а – линейный размер клетки; V – объем клетки; V_{аро} – объем апопласта; D – коэффициент диффузии.

Вероятность перехода между незаряженной CO₂ и заряженной HCO₃⁻ формами углекислого газа в зависимости от pH среды описывалась в соответствии с работой Сухова, Сухов (2018):

$$P_{CO_2} = \frac{1}{1+10^{pH-pK}} \quad (2.30),$$

где pH – показатель кислотности среды, включая апопласт, цитоплазму и хлоропласты; pK – константа равновесия перехода между незаряженной CO₂ и заряженной HCO₃⁻ формами углекислого газа в зависимости от pH среды.

Вероятно, перенос углекислого газа через мембраны может осуществляться посредством аквапоринов (Gallé et al., 2013). Мы описали перемещение нейтральной форм углекислого газа через плазмалемму и в хлоропласты на основе уравнения Фика с учетом объемов компартментов:

$$\frac{dC_{out}}{dt} = k_r^{out} g_{CO_2} (C_{atmo} - C_{out}) - k_r^{out} g_{pm} (C_{out} - C_{in}),$$

$$\frac{dC_{in}}{dt} = k_r^{in} g_{pm} (C_{out} - C_{in}) - k_r^{in} g_{Chl} (C_{in} - C_{chl}) + k_r^{in} (Rs + V_{phr}) \quad (2.31),$$

$$\frac{dC_{chl}}{dt} = k_r^{chl} g_{Chl} (C_{in} - C_{chl}) - k_r^{chl} A,$$

где C_{atmo} – содержание CO₂ в атмосфере; C_{out} – содержание CO₂ в межклеточном пространстве; C_{in} – содержание CO₂ в цитоплазме; C_{chl} – содержание CO₂ в хлоропластах; $\mathbf{k_r^{out}}$, $\mathbf{k_r^{in}}$, $\mathbf{k_r^{chl}}$ – коэффициенты разбавления для межклеточного пространства, цитоплазмы и хлоропластов, соответственно, рассчитанные на основе соотношения объемов компартментов и листа; g_{pm} и g_{Chl} – проводимости плазмалеммы и внешней мембраны хлоропластов, соответственно; Rs – активность дыхания; V_{phr} – активность фотодыхания. Проводимость плазматической мембраны (g_{pm}) и внешней мембраны хлоропластов для CO₂ (g_{Chl}) считали, как:

$$g_{Chl} = \frac{g_m(1+A_1)}{A_1}$$
 (2.32),
$$g_{pm} = A_1 g_{Chl}$$

где A₁ –отношение проводимости плазмалеммы к проводимости мембран хлоропластов для CO₂.

Также было описаны изменения концентрации CO₂, выделяющегося в цитоплазме процессе в дыхания и фотодыхания; в хлоропластах изменения вызваны потреблением CO₂ в процессе ассимиляции (Farquhar et al., 1980; von Caemmerer et al., 2009).

Описание ассимиляции углекислого газа, дыхания и содержания АТФ

Ассимиляцию CO₂ в процессе фотосинтеза описывали с использованием модели Farquhar-von Caemmerer-Berry конкурентного связывания углекислого газа и кислорода с РУБИСКО (Farquhar et al., 1980; von Caemmerer et al., 2009). Для простоты, было принято, что РУБИСКО связывается с формой незаряженной формой CO₂, и не связывается с HCO₃⁻, поскольку на этот счет нет единого мнения в литературе. В модели ассимиляция (A) лимитируется потоком электронов через электрон-транспортную цепь (ЭТЦ) хлоропластов (W_i), пропорционального свету, и притоком углекислого газа (W_c):

$$A = \min(W_c, W_j) \frac{C - \Gamma}{c} - Rs \quad (2.33)$$
$$W_c = \frac{V_{max} CO_2}{CO_2 + K_C \left(1 + \frac{O_2}{K_0}\right)}$$
$$W_j = \frac{J}{4 + 8\frac{\Gamma}{CO_2}}$$

где V_{max} – максимальная скорость работы РУБИСКО; СО₂ и O₂ – содержание углекислого газа и кислорода; K_C и K_O – константы скорости связывания углекислого газа и кислорода с РУБИСКО; Rs – активность дыхания (константа); Г – содержание СО₂, при котором происходит компенсация ассимиляции и дыхания; J – поток электронов через ЭТЦ хлоропластов, который описывали следующей формулой:

$$J = \frac{I + J_{max}}{2\theta} - \frac{\sqrt{(I + J_{max})^2 - 4\theta I J_{max}}}{2\theta} \quad (2.34),$$
$$I = \frac{abs(1-f)}{2} Light,$$

где J_{max} – максимальный поток электронов через ЭТЦ; Light – поток света, падающий на растение; I – поглощенный реакционными центрами свет; ϑ – эмпирический коэффициент; f – коэффициент «качества» спектральных свойств света для реакционных центров; abs – коэффициент эффективности поглощения света.

Было принято, что активность дыхания (Rs) равна константе. Фотодыхание описывали следующей формулой:

$$V_{phr} = \frac{A\Gamma}{co_2} \qquad (2.35)$$

Содержание АТФ в клетках описывали стационарно:

$$ATP = \frac{\beta_{ATP} \kappa_{cons}(Rs + \alpha A)}{\beta_{A + \alpha} \beta_{A + \alpha} \beta_{A + ATP_{\Sigma}}} \quad (2.36),$$

где ATP_{Σ} – суммарная концентрация $AT\Phi$ и $AД\Phi$; K_{cons} – коэффициент скорости потребления $AT\Phi$; α – весовой коэффициент для вклада ассимиляции; β_{ATP} – константа.

Параметризация и численное решение модели

Модель решалась численно, методом Эйлера. Для ее решения был разработан специальный программный инструмент на языке C++. В таблице 2.1. приведены параметры модели, использованные для ее решения.

Таблица 2.1

Параметры, используемые в математической модели фотосинтетически активного листа

Электрогенез					
E_m	-0.160	В	Вычислено		
К1	0.045	c ⁻¹	Sukhova et al., 2021		
К2	2.58.10-5	c ⁻¹	Sukhova et al., 2021		
K _{ATP}	186.10-6	М	Kinoshita, Shimazaki, 1999		
K _{cyt}	5.676		Ha основе Winter et al., 1994		
A_{BL0}	0.566		Kinoshita, Shimazaki, 1999		
BL	6.55	µмоль м ⁻² с ⁻¹	Kinoshita, Shimazaki, 1999		
u_{kg}	-7.4		Sukhov et al., 2009		
u _{kd}	-2.53		Sukhov et al., 2009		
c_{kg}	1.1		Sukhov et al., 2009		
c_{kd}	1.13		Sukhov et al., 2009		
ant	0.015	$M^{-1} c^{-1}$	Sukhov et al., 2009		
Диффузия ионов					
D _{Hout}	7.8 10-6	дм c ⁻¹	Sukhov et al., 2011		
D _{Kout}	1.96 10-6	дм c ⁻¹	Sukhov et al., 2011		

D _{CO2}	1.83 · 10-8	дм c ⁻¹	Tholen, Zhu, 2011				
D _{HCO3} -	$0.52 \cdot D_{CO2}$	дм c ⁻¹	Tholen, Zhu, 2011				
	Буферные сн	зойства растворов в	компартментов				
B_{out}^{Σ}	0.083	Μ	Sukhov et al., 2009				
πΣ	0.002	М	Sukboy at al 2000				
n _{out}	0.002	171	Sukilov et al., 2003				
K ^Σ	0.082	М	Sukhov et al., 2009				
5000			C 11 1 C 000				
B_{in}^{L}	0.2	М	Sukhov et al., 2009				
HΣ	0.015	М	Sukhov et al. 2009				
¹¹ in	0.015	111	Suriov et al., 2009				
K _{in}	0.14	М	Вычислено				
K _H	10-6	М	Sukhov et al., 2009				
KK	10-4	М	Sukhov et al., 2009				
K _{Hin}	10-6	М	Sukhov et al., 2009				
		Обмен СО2					
K _C	260	μбар	von Caemmerer et al., 2009				
Ko	179	тбар	von Caemmerer et al., 2009				
V _{max}	80	μ моль м ⁻² с ⁻¹	von Caemmerer et al., 2009				
Г	38.6	µбар СО2	von Caemmerer et al. 2009				
po2	200	мбар	von Caemmerer et al., 2009				
J _{max}	160	μ моль м ⁻² с ⁻¹	von Caemmerer et al., 2009				
abs	0.85		von Caemmerer et al., 2009				
f	0.15		von Caemmerer et al., 2009				
θ	0.7		von Caemmerer et al., 2009				
CO _{2 atmo}	360	ppm	von Caemmerer et al., 2009				
Rs	1	μ моль м ⁻² с ⁻¹	von Caemmerer et al., 2009				
$g_{\rm CO2}/g_{\rm s}$	1.6		Cabrera et al. 2021				
vpd	8.84		Принято				
gz	56.895	µмоль кПа ⁻¹ м ⁻²	Вычислено				
		c-1					
φs	0	кПа	Принято				
β	3.23	kПа м ² с ммоль ⁻¹	Вычислено				
A_1	1		Ha основе Evans et al. 2009;				
			Tholen, Zhu, 2011				
Scell	15	$M^2 M^{-2}$	Ha основе Tholen, Zhu, 2011				
Schl	30.3	$M^2 M^{-2}$	Tholen Zhu 2011				
S	50.5	141 141	Thorem, Zhu, 2011				
leaf	0.1	$MOTI M^{-2} c^{-1}$	Flavos at al 2012				
gm	0.1	MOJIE M C	REPRESENT				
<u> </u>	0.13	MOJIE M C $10^{-2} c^{-1}$					
g chl	0.5	моль м с	рычислено				

pK	6.35		Булычев и др., 2001			
Изменение АТР						
α	0.2		На основе Roeske, Chollet, 1989			
$\operatorname{ATP}_{\Sigma}$	0.132.10-3	М	Roeske, Chollet, 1989			
ATP _{dark}	0.065.10-3	М	Roeske, Chollet, 1989			
K _{cons}	0.3846	c ⁻¹	Ha основе Roeske, Chollet, 1989			
Параметры клетки и листа						
Cell size	size 100 · 10 ⁻⁵ дм Sukhov et al., 2011					
V _{cyt}	$0.04 V_{cell}$	Л	Winter et al., 1994			
$\mathbf{V}_{\mathrm{apo}}$	$0.1 V_{cell}$	Л	Gradmann, 2001			
S_{leaf}/V_{leaf}	5000	$M^2 M^{-3}$	Day, Vogelmann, 1995			
Прочие константы						
Т	296	K	Принято			
F	96500	С моль-1				
R	8.31	Дж моль ⁻¹ К ⁻¹				
G	50000	Дж	Sukhov et al., 2009			
Δt_1	0.5	С	Принято			
Δt_2	0.05	с	Принято			

2.8. Статистическая обработка результатов

В большинстве вариантов анализа использовалась параметрическая статистика (средние, стандартное отклонение, отклонение среднего, коэффициент вариации, т-тест Стьюдента). В некоторых вариантах анализа использовалась непараметрическая статистика (медианы, тест Манн-Уитни), в тексте эти случаи указаны отдельно. Количество повторов п указывается в подписях к рисункам.

ГЛАВА 3. КОМПЛЕКСНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ НОРМАЛИЗОВАННЫХ ИНДЕКСОВ ОТРАЖЕНИЯ ПРИ ДЕЙСТВИИ НЕБЛА-ГОПРИЯТНЫХ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Спектры отражения несут важную информацию о состоянии растений, включая активность физиологических процессов (Balzarolo et al., 2018), изменение состава пигментов и воды (Lu et al., 2015; Sun et al., 2019) и др. Комплексное исследование спектров отражения, в частности на основании расчета всех возможных индексов отражения, позволяет выявить чувствительные к действию неблагоприятных факторов спектральные области (Klem et al., 2017; El-Hendawy et al., 2019). Вследствие этого подобное комплексное исследование было проведено на первом этапе исследования.

3.1. Комплексное исследование изменений индексов отражения листа в условиях кратковременного водного дефицита

Нами было проведено комплексное исследование влияния кратковременного водного дефицита на индексы отражения у листьев гороха, выращенного на песке. Такой водный дефицит является простой моделью почвенной засухи. Проведенное исследование было направлено на выявление спектральных областей для расчета наиболее чувствительных к действию данного неблагоприятного фактора индексов отражения, которые, как следствие, являются перспективными для оценки состояния растения в условиях засухи. В этой серии экспериментов спектры отраженного света измеряли у фиксированных в пространстве листьев гороха.

Рисунок 3.1. показывает, что кратковременный водный дефицит вызывал снижение относительного содержания воды в побегах растений (RWC) и максимального квантового выхода фотохимических реакций фотосистемы II (Fv/Fm). Статистически значимые отличия исследованных показателей от контроля наблюдались начиная со вторых суток после прекращения полива растений. При этом к концу периода водного дефицита RWC снижалось примерно на 14 % (Puc.3.1a), а Fv/Fm на 15 % (Puc.3.16). Важно отметить, что максимальный квантовый выход и содержание воды в побегах были связаны линейно; коэффициент корреляции между величинами был высоким (R = 0.82) и имел статистический значимый характер (Puc.3.1в). Полученные результаты подтверждают неблагоприятное влияние водного дефицита на растения гороха и показывают возможность использования этой экспериментальной схемы в дальнейшем исследовании.



Рис.3.1. Динамика изменения относительного содержания воды в побегах (RWC) (а) и максимального квантового выхода фотосистемы II (Fv/Fm) (б) в условиях кратковременного водного дефицита на примере гороха, а также диаграмма рассеяния между Fv/Fm и RWC (в). На рисунке представлены медианы исследуемых показателей. *, p < 0.05 (Манн-Уитни U-тест) (n=6).

Далее нами было проведено комплексное исследование индексов отражения листьев гороха в условиях кратковременного водного дефицита. Результаты представлены в виде тепловых карт, показывающих области с достоверными различиями между величинами индексов отражения в опыте и контроле, а также – направления таких различий (Рис.3.2). При этом, на тепловой карте по осям отложены длины волн, на основе которых рассчитывали индексы отражения (λ 1 по оси абсцисс и λ 2 по оси ординат); синим отмечены спектральные области с достоверным снижением индексов в опыте по сравнению с контролем, красным – области с достоверным возрастанием индексов отражения. Спектральные области, в которых статистические значимые различия, отсутствовали были выделены серым.



Рис.3.2. Тепловые карты достоверности различий между медианными значениями индексов отражения в опыте и контроле после 1 (а), 2 (б), 3 (в), 4 (г), 5 (д) суток отсутствия полива растений гороха. По осям отложены длины волн, на основе которых рассчитывали индексы отражения; синим отмечены области с достоверным снижением индексов в опыте, красным – с достоверным возрастанием. Достоверность различий оценивали на основе Манн-Уитни U-теста, *n*=6.

Было показано, что через сутки после начала водного дефицита появлялись две области с достоверными изменениями индексов отражения (снижение или возрастание) в опыте (Рис.3.2а). На второй день наблюдалось только достоверное возрастание индексов в некоторых областях, достоверные снижения индексов отражения не были выраженными (Рис.3.2б). Начиная с третьего дня водного дефицита наблюдались значительные по своей величине спектральные области с достоверным снижением и достоверным возрастанием индексов отражения (Рис.3.2в), которые продолжали увеличиваться на четвертые и пятые сутки (Рис.3.2г, д).

В ходе дальнейшего исследования, были построены аналогичные тепловые карты, показывающих различия между опытом и контролем у светоиндуцированных изменений индексов отражения (ΔRI) (Рис.3.3). Показано, что изменения ΔRI были менее выражены, нежели величины RI: на 1-3и сутки водного дефицита различия между светоиндуцированными изменениями в опыте и контроле затрагивали лишь небольшие спектральные области (Рис.3.3 а-в) и лишь на 4-5-е сутки происходило значительное увеличение спектральных областей с достоверными изменениями ΔRI (Рис.3.3г, д).

Далее мы определили процент RI и Δ RI, которые начинали статистически значимо и стабильно меняться при различной длительности действия водного дефицита. При этом, за начало стабильного изменения RI или Δ RI принимались те сутки эксперимента, которые удовлетворяли двум условиям: (i) между опытными и контрольными показателями наблюдались статистически значимые различия и (ii) выявленные различия оставались достоверными на всех последующих измерениях этого индекса. Такой подход позволил исключить из рассмотрения индексы отражения, имеющие сложную зависимость от длительности водного дефицита (например, достоверно меняющиеся на ранних стадиях такого дефицита и не отличающиеся от контрольных значений на более поздних стадиях) или имеющие высокую чувствительность к особенностям конкретного измерения (т. е. подверженные шуму при измерении).

Было показано (Таблица 3.1), что только около 0.19% от общего количества индексов отражения были чувствительны к действию водного дефицита на протяжении всего эксперимента (1-5-е сутки), при этом процент достоверно меняющихся индексов возрастал на более поздних сроках водного дефицита (например, около 71% от общего количества индексов менялась на 4е сутки водного дефицита).



Рис.3.3. Тепловые карты достоверности различий между медианами светоиндуцированных изменений индексов отражения (Δ RI) в опыте и контроле после 1 (a), 2 (б), 3 (в), 4 (г), 5 (д) суток отсутствия полива растений гороха. По осям отложены длины волн, на основе которых рассчитывали Δ RI; синим отмечены области с достоверным снижением Δ RI в опыте, красным – с достоверным возрастанием. Достоверность различий оценивали на основе Манн-Уитни U-теста, *n*=6.

Таблица 3.1.

Доля RI и ΔRI с различным началом изменений при развитии кратковременного водного дефицита, рассчитанная по отношение к общему числу индексов

	Период водного дефицита				
	1-5-е сутки	2-5-е сутки	3-5-е сутки	4-5-е сутки	5-е сутки
RI	0.19%	1.75%	22.87%	51.03%	71.16%
ΔRI	0%	0%	1.52%	15.60%	31.32%

В ходе эксперимента не было обнаружено Δ RI, которые начинали стабильно меняться на 1-е или 2-е сутки эксперимента (Таблица 3.1). В ходе дальнейшего развития водного дефицита Δ RI также начинали изменяться, достигая достаточно высокой доли от общего числа индексов на последние сутки эксперимента. Тем не менее, сравнение RI и Δ RI показывает, что процент чувствительных к водному дефициту RI был всегда выше аналогичной величины для Δ RI.

Потенциально, чувствительность RI и Δ RI к действию водного дефицита может быть связана с зависимостью абсолютных значений индексов и их светоиндуцированных изменений от различных групп процессов. В частности, величина RI, которая измеряется после 7 мин освещения, имеет комплексный характер, включая в себя как начальную («темновую») величину индекса, так и его изменения на свету. Это означает, что RI может зависеть как от быстрых (сопоставимых с длительностью освещения при измерении), так и от медленных (часы и дни) процессов. К последним относятся изменения содержания и состава фотосинтетических пигментов, которые, как известно, развиваются у растений в условиях дефицита воды (Batra et al., 2014; Sun et al., 2014; Bayat et al., 2016; Guo et al., 2016).

Напротив, ΔRI представляют собой индуцированные светом изменения RI, развивающиеся в пределах 7 мин освещения; такой метод измерения позволяет исключить влияние «темновой» величины индекса на показатель. Известно, что существуют многочисленные фотосинтетические изменения, которые формируются при освещении в пределах минутного временного интервала: изменение электрохимического градиента протонов (Demmig-Adams, 1990; Müller et al., 2001), активация фотосинтетической электрон-транспортной цепи (Kalaji et al., 2014), формирование энергозависимой компоненты нефотохимического тушения (Müller et al., 2001; Ruban, 2016) и другие. Эти изменения фотосинтетической активности и связанных с ней процессов могут влиять на отражательную способность растений; например, через модификацию коэффициентов отражения в зеленой области (Gamon et al., 1992; Zhang et al., 2016).

Таким образом, можно предполагать, что различная чувствительность медленных и быстрых фотосинтетических изменений к действию кратковременного водного дефицита является причиной различной чувствительности RI и Δ RI к действию этого фактора. Несмотря на то, что конкретные механизмы различного изменения RI и Δ RI при водном дефиците требуют будущих исследований, полученные результаты показывают, что с прикладной точки зрения наибольший интерес для дальнейшего исследования представляют собой RI, которые начинают меняться на 1е или 2е сутки водного дефицита, так как именно такие индексы могут стать новыми инструментами для раннего выявления действия водного дефицита на растения при их дистанционном мониторинге.

Дальнейший анализ выявил (Таблица 3.2) 46 индексов отражения, которые соответствовали этому условию. При этом важно отметить, что выявленные индексы отражения имели, в большинстве своем, сильную линейную связь с максимальным квантовым выходом фотосистемы II и относительным содержанием воды в побегах растений.

Таблица 3.2.

Индексы отражения (RI), изменения которых начинались на 1-е или 2-е сутки развития водного дефицита у растений, и коэффициенты корреляции таких индексов с максимальным квантовым выходом фотохимических реакций фотосистемы II (Fv/Fm) и относительным содержанием воды в побегах (RWC).

Иннова от	Стабильные	Коэффициент корре-	Коэффициент	Направление
индекс от-	изменения	ляции между RI и	корреляции между	изменений RI
ражения		Fv/Fm	RI и RWC	
RI(621, 442)	1-5-е сутки	-0.7435 *	-0.8618 *	Возрастание
RI(629, 442)	1-5-е сутки	-0.7606 *	-0.8814 *	Возрастание
RI(633, 442)	1-5-е сутки	-0.7539 *	-0.8576 *	Возрастание
RI(637, 442)	1-5-е сутки	-0.7636 *	-0.8654 *	Возрастание
RI(700, 442)	1-5-е сутки	-0.7223 *	-0.8281 *	Возрастание
RI(475, 450)	2-5-е сутки	-0.6312	-0.8849 *	Возрастание
RI(487, 421)	2-5-е сутки	-0.8396 *	-0.8985 *	Возрастание
RI(487, 458)	2-5-е сутки	-0.7208 *	-0.8039 *	Возрастание
RI(491, 421)	2-5-е сутки	-0.8666 *	-0.8983 *	Возрастание
RI(496, 421)	2-5-е сутки	-0.8326 *	-0.9099 *	Возрастание
RI(496, 479)	2-5-е сутки	-0.6760 *	-0.8831 *	Возрастание
RI(496, 483)	2-5-е сутки	-0.6754 *	-0.8997 *	Возрастание
$RI(\overline{500, 421})$	2-5-е сутки	-0.8300 *	-0.9272 *	Возрастание
RI(500, 450)	2-5-е сутки	-0.7071 *	-0.9244 *	Возрастание

2-5-е сутки	-0.8178 *	-0.9721 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.6811 *	-0.9096 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.7159 *	-0.9491 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.8219 *	-0.9346 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.7061 *	-0.9328 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.7963 *	-0.9404 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.7075 *	-0.9309 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.7957 *	-0.9308 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.7642 *	-0.9077 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.9252 *	-0.9184 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.7970 *	-0.8835 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.7998 *	-0.8851 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.7968 *	-0.8817 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.8061 *	-0.9084 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.8077 *	-0.9210 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.8101 *	-0.9074 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.8099 *	-0.9202 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.8173 *	-0.9121 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.8173 *	-0.9213 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.8183 *	-0.9063 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.8166 *	-0.9135 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.8153 *	-0.9033 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.8441 *	-0.8884 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.8237 *	-0.9037 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.8288 *	-0.9027 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.8317 *	-0.8973 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.8399 *	-0.9041 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.8822 *	-0.8702 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.8431 *	-0.9067 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.8250 *	-0.9145 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.8414 *	-0.9190 *	Возрастание
2-5-е сутки	-0.8020 *	-0.9117 *	Возрастание
	2-5-е сутки 2-5-е сутки 2	2-5-е сутки-0.8178 *2-5-е сутки-0.6811 *2-5-е сутки-0.7159 *2-5-е сутки-0.7061 *2-5-е сутки-0.7063 *2-5-е сутки-0.7075 *2-5-е сутки-0.7075 *2-5-е сутки-0.7642 *2-5-е сутки-0.7970 *2-5-е сутки-0.7998 *2-5-е сутки-0.7968 *2-5-е сутки-0.7968 *2-5-е сутки-0.8061 *2-5-е сутки-0.8061 *2-5-е сутки-0.8101 *2-5-е сутки-0.8173 *2-5-е сутки-0.8173 *2-5-е сутки-0.8173 *2-5-е сутки-0.8173 *2-5-е сутки-0.8173 *2-5-е сутки-0.8173 *2-5-е сутки-0.8166 *2-5-е сутки-0.8153 *2-5-е сутки-0.8237 *2-5-е сутки-0.8317 *2-5-е сутки-0.8317 *2-5-е сутки-0.8329 *2-5-е сутки-0.8329 *2-5-е сутки-0.8431 *2-5-е сутки-0.8431 *2-5-е сутки-0.8431 *2-5-е сутки-0.8414 *2-5-е сутки-0.8414 *2-5-е сутки-0.8414 *2-5-е сутки-0.8414 *2-5-е сутки-0.8431 *2-5-е сутки-0.8414 *2-5-е сутки-0.8020 *	2-5-е сутки-0.8178 *-0.9721 *2-5-е сутки-0.6811 *-0.9096 *2-5-е сутки-0.7159 *-0.9491 *2-5-е сутки-0.8219 *-0.9346 *2-5-е сутки-0.7061 *-0.9328 *2-5-е сутки-0.7063 *-0.9404 *2-5-е сутки-0.7075 *-0.9309 *2-5-е сутки-0.7957 *-0.9308 *2-5-е сутки-0.7957 *-0.9308 *2-5-е сутки-0.7957 *-0.9308 *2-5-е сутки-0.7957 *-0.9308 *2-5-е сутки-0.7970 *-0.8835 *2-5-е сутки-0.7970 *-0.8835 *2-5-е сутки-0.7998 *-0.8851 *2-5-е сутки-0.7968 *-0.8817 *2-5-е сутки-0.8061 *-0.9084 *2-5-е сутки-0.8077 *-0.9210 *2-5-е сутки-0.8173 *-0.9213 *2-5-е сутки-0.8173 *-0.9213 *2-5-е сутки-0.8173 *-0.9213 *2-5-е сутки-0.8166 *-0.9135 *2-5-е сутки-0.8166 *-0.9135 *2-5-е сутки-0.8237 *-0.9037 *2-5-е сутки-0.8288 *-0.9027 *2-5-е сутки-0.8288 *-0.9027 *2-5-е сутки-0.8237 *-0.9041 *2-5-е сутки-0.8317 *-0.8973 *2-5-е сутки-0.8228 *-0.8702 *2-5-е сутки-0.8250 *-0.9145 *2-5-е сутки-0.8250 *-0.9145 *2-5-е сутки-0.8250 *-0.9145 *2-5-е сутки

*, достоверные корреляции (p < 0.05), n = 10

Таким образом, полученные результаты показывают ряд новых индексов отражения, которые потенциально могут быть использованы для выявления действия неблагоприятных факторов на растения. В то же время, дальнейшего исследования требует оценка эффективности таких индексов при развитии длительной почвенной засухи, которая в большей степени соответствует условиям поля, нежели использованная экспериментальная модель, при измерениях в других условиях (в частности, при исследовании не фиксированных в пространстве листьев, а растительного покрова), а также – при изучении других видов растений.

3.2. Комплексное исследование влияния повышенной температуры на индексы отражения листа

Температура является важным фактором окружающей среды, негативно влияющим на метаболизм растений и даже вызывающий у них серьезные повреждения. Нагревание растений зачастую сопровождает другие типы стрессоров, включая избыточный свет и засуха и др. По этой причине, следующий этап был посвящен комплексному исследованию влияния повышенной температуры (кратковременный нагрев) на индексы отражения растений. Исследования проводили на фиксированных в пространстве листьях у растений гороха, пшеницы и тыквы; прежде всего, было изучено влияние такого нагрева на Fv/Fm (Рис. 3.4.).



Рис.3.4. Изменения медианных значений максимального квантового выхода фотохимических реакций фотосистемы II (Fv/Fm) через 1 час и через 1 день после нагрева у гороха (n=5) (a), пшеницы (n=6) (б) и тыквы (n=6) (в). *, p < 0.5 (Манн-Уитни U-тест).

Было показано, что действие повышенной температуры вызывало достоверное снижение Fv/Fm у всех исследованных растений через час после их нагрева растений (Рис.3.4). Через сутки после нагрева Fv/Fm продолжал снижаться у гороха (Рис.3.4а) и частично восстанавливался у пшеницы (Рис.3.4б) и тыквы (Рис.3.4в). Далее было прове-

дено исследование влияния кратковременного воздействия повышенной температуры на индексы отражения у гороха, пшеницы и тыквы (Рис.3.5).

Было показано, что тепловое воздействие вызывало появление двух больших спектральных областей со значительными различиями RI между контролем и опытом (с возрастанием и снижением индексов отражения) через 1 час после нагрева у растений гороха (Рис.3.5а) и тыквы (Рис.3.5д). Через сутки после нагрева, у гороха и тыквы наблюдалось уменьшение спектральных областей с достоверными различиями RI между опытом и контролем (включая практически полное отсутствие снижения индексов отражения), а также их некоторое смещение (Рис.3.4б, е). Важно отметить, что уменьшение спектральных областей с меняющимися RI было более выражено у тыквы и менее выражено у гороха. В случае пшеницы наблюдались лишь небольшие спектральные области со значительными повышениями RI через 1 час (Рис.3.5в) и 1 день (Рис.3.5г) после кратковременного нагревания.

Рисунок 3.6 показывает тепловые карты достоверности различий между опытом (кратковременное действие повышенной температуры) и контролем для светоиндуцированных изменений индексов отражения (Δ RI). Было показано, что через 1 час после нагрева, у всех исследованных растений наблюдалось несколько обширных спектральных областей с достоверными различиями Δ RI между контролем и опытом (Рис.3.6а, в, д). Через сутки после нагрева такие различия были по-прежнему сильно выражены для гороха (Рис.3.6б), у тыквы площадь спектральных областей с достоверными изменениями Δ RI значительно снижалась (Рис.3.6г), у пшеницы изменения Δ RI практически полностью отсутствовали (Рис.3.6е). Важно также отметить, что некоторые спектральные области с изменениями Δ RI были сходны для всех исследованных растений. Например, большая спектральная область со снижением Δ RI (λ 1 около 570–610 нм, λ 1 около 510–570 нм) наблюдалась одновременно у гороха, пшеницы и тыквы через 1 час после кратковременного воздействия повышенной температуры. Через 1 сутки после действия нагрева общие области изменения Δ RI для растений различных видов практически отсутствовали.

Интересно отметить, что, как и в случае воздействия кратковременного водного дефицита между спектральными областями с изменениями RI и спектральными областями с изменениями ΔRI не наблюдается выраженного сходства. Такой подтверждает возможность различных механизмов изменения RI и ΔRI



Рис.3.5. Тепловые карты достоверности различий медианных значений индексов отражения (RI) между опытом и контролем через 1 час после нагрева у гороха (n=5) (a), пшеницы (n=6) (в) и тыквы (n=6) (д). Тепловые карты достоверности различий индексов отражения между опытом и контролем через 1 сутки после нагрева у гороха (n=5) (б), пшеницы (n=6) (г) и тыквы (n=6) (е). По осям отложены длины волн, на основе которых рассчитывали индексы отражения; синим отмечены достоверные снижения индексов в опыте, красным – достоверные возрастания. Достоверность различий оценивали на основе Манн-Уитни U-теста.



Рис.3.6. Тепловые карты достоверности различий между медианами светоиндуцированных изменений индексов отражения (Δ RI) в опыте и контроле через 1 час после нагрева у гороха (n=5) (a), пшеницы (n=6) (в) и тыквы (n=6) (д). Тепловые карты достоверности различий между медианами светоиндуцированных изменений индексов отражения (Δ RI) в опыте и контроле через 1 сутки после нагрева у гороха (n=5) (б), пшеницы (n=6) (г) и тыквы (n=6) (е). По осям отложены длины волн, на основе которых рассчитывали Δ RI; синим отмечены достоверные снижения Δ RI в опыте, красным – достоверные возрастания. Достоверность различий оценивали на основе Манн-Уитни U-теста.

Динамика изменений Δ RI в случае пшеницы (и в частности, отсутствие различий через сутки после нагрева) хорошо согласуется с динамикой максимального квантового выхода фотохимических реакций фотосистемы II (Рис.3.4б). Вероятно, температурный шок вызывал только кратковременное нарушение фотосинтетических процессов у пшеницы, не вызывав долговременных повреждений. В случае же гороха повреждение фотосинтетического аппарата было значительно сильнее, чем у пшеницы, и сохранялось даже через сутки после нагрева растений (Рис.3.4а). С этим хорошо согласуется наличие значительных спектральных областей с достоверными изменениями RI (Рис.3.5в, г) и Δ RI (Рис.3.6в, г) через час и через сутки нагрева растений. В свою очередь, повреждение тыквы было более слабым, нежели гороха, а через сутки после нагрева – наблюдалось практически полное восстановление Fv/Fm. Этот результат также согласуется с менее выраженным по сравнению с горохом изменением RI (Рис.3.5д, е) и Δ RI (Рис.3.6д, е).

3.3. Комплексное исследование индексов отражения листа в условиях длительной почвенной засухи

На следующем этапе, было выполнено дополнительное исследование влияния длительной почвенной засухи на найденные нормализованные индексы отражения (Таблица 3.2), целью которого являлась проверка эффективности таких индексов для оценки состояния растений в условиях водного стресса. Для этого в условия эксперимента был внесен ряд существенных изменений по сравнению с исследованием влияния на индексы отражения кратковременного водного дефицита. Во-первых, исследования были проведены на двух растительных объектах (горох и пшеница). Во-вторых, растения выращивали на почве, что значительно замедляло развитие засухи (до нескольких недель) и соответствовало развитию засухи в условиях открытого грунта. В-третьих, измерения проводились не на фиксированных в пространстве листьях, а на модели растительного покрова, которые был имитирован массивом вегетационных сосудов с растениями. Такие модификации эксперимента позволяли проверить эффективность обнаруженных индексов в условиях близких к реальным.

Прежде всего, было показано, что почвенная засуха вызывала снижение относительного содержания воды в побегах растений. При этом у гороха небольшие достоверные различия наблюдались уже со вторых суток засухи и значительно увеличились после седьмых суток (Рис.3.7а). В свою очередь, у пшеницы достоверное снижение содер-

жания воды в побегах наблюдалось, начиная с 13-х суток отсутствия полива (Рис.3.76). В целом, снижение содержания воды в побегах гороха при развитии засухи были около 10%, у пшеницы примерно 61%.



Рис.3.7. Динамика относительного содержания воды в побегах (RWC) у гороха (n=6) (a) и пшеницы (n=4-6) (б) в условиях развития почвенной засухи.

Далее была проведена оценка эффективности ранее выявленных 46 нормализованных индексов отражения (см. список индексов в Таблице 3.2) в новых экспериментальных условиях (два вида растений, длительная почвенная засуха, измерение спектров отражения с растительного покрова). Было показано, что часть ранее выявленных индексов индексов сохраняла высокую чувствительность к действию засухи на растения гороха, а некоторые индексы демонстрировали статистически значимые изменения у пшеницы (данные не приведены).

В то же время, было выявлено только два индекса отражения (RI(613, 605) и RI(670, 432)), которые достоверно и однонаправленно менялись как для гороха, так и для пшеницы. При этом оба индекса возрастали по отношению к контролю в ходе развития засухи (Рис.3.8), что хорошо соответствовало их изменениям, показанным при кратковременном водном дефиците (Таблица 3.2). У гороха было показано, что RI(613, 605) достоверно возрастал с 5-го дня засухи (Рис.3.8а), а RI(670, 432) – с 9-го дня (Рис.3.86). У пшеницы RI(613, 605) и RI(670, 432) возрастали начиная с 7-го дня засухи (Рис.3.8в, г). Также было выявлено (Рис.3.9), что связь обоих индексов с RWC была высокой во всех экспериментальных вариантах: абсолютное значение коэффициента корреляции было выше 0.9 (R), коэффициент детерминации (R^2) был 0.85–0.86.



Рис. 3.8. Динамика нормализованного индекса отражения RI(613, 605) у гороха (а) и пшеницы (в) в нормализованного индекса отражения RI(670, 432) у гороха (n=45) (б) и пшеницы (n=45) (г) в условиях почвенной засухи.

Полученные результаты показывают, что выявленные индексы могут быть эффективным инструментом для дистанционного мониторинга состояния растений в условиях развития почвенной засухи. Можно предположить, что изменения RI(613, 605) могут быть связаны с изменениями концентраций хлорофиллов а (Chl a) и b (Chl b) и соотношением их концентраций (Chl a / Chl b) при развитии почвенной засухи (Batra et al., 2014; Guo et al., 2016). Известно, что вклад Chl a и Chl b в поглощение света на длинах волн 613 и 605 нм неодинаков (Kume et al., 2018; Schwieterman, 2018), а деградация этих хлорофиллов происходит с различными скоростями: Chl a часто разрушается медленнее, чем Chl b, приводя к возрастанию Chl a/ Chl b (Liu et al., 2011; Batra et al., 2014; Guo et al., 2016). Такие различия в распаде хлорофиллов могут, потенциально, оказывать влияние на отражение света растениями на длинах волны 613 и 605 нм.



Рис. 3.9. Диаграммы рассеяния между относительным содержанием воды в побегах (RWC) и индексом отражения RI(613, 605) у гороха (n=7) (a) и пшеницы (n=8) (в) и между RWC и индексом отражения RI(670, 432) у гороха (n=7) (б) и пшеницы (n=8) (г) в условиях почвенной засухи.

Механизм изменения индекса RI(670, 432), по-видимому, связан с поглощением пигментов в синей и красной области, которое влияет на отражения листа в этих спектральных областях. Так поглощение на длинах волн 432 и 670 нм приблизительно соответствует пикам Chl a (Kume et al., 2018); с другой стороны, в поглощение света на 432 нм могут вносить вклад каротиноиды, поглощающие свет в диапазоне около 360-520 нм (Kume et al., 2018; Schwieterman, 2018). Известно, что при стрессовых воздействиях каротиноиды разрушаются медленнее, чем хлорофиллы (Merzlyak et al., 1999; Sims, Gamon, 2002; Liu et al., 2011). Такое различие в скорости деградации пигментов приводит к тому, что при действии неблагоприятных факторов поглощение в синей области спектра снижается медленнее, чем в красной области, поэтому отражение в красной области растет быстрее (Merzlyak et al., 1999). Таким образом, разница отражения на дли-

нах волн 670 и 432 нм должна расти при развитии засухи, что объясняет выявленное в экспериментах возрастание индекса отражения RI(670, 432).

В целом, на основании комплексного исследования спектров отражения были выявлены оптические области и нормализованные индексы отражения с наибольшей чувствительностью к действию водного дефицита. При этом, наиболее эффективными оказались индексы отражения RI(613, 605) и RI(670, 432), которые меняются в экспериментальных условиях близких к реальным. Можно предполагать, что предложенные индексы будут также эффективны для выявления системного действия других неблагоприятных факторов (например, избыточный свет или засоление).

3.4. Комплексное исследование индексов отражения при локальном повреждении и распространении электрических сигналов

На следующем этапе исследования была предпринята попытка ответить на вопрос: могут ли индексы отражения показывать быстрые изменения физиологических процессов в интактных частях растения при локальном действии повреждающих факторов и распространении по растению стрессовых сигналов электрической природы?

Известно, что электрические сигналы (и, в частности, вариабельный потенциал, ВП) участвуют в передачи информации от поврежденной части растений (Gallé et al., 2015), вызывая инактивацию фотосинтеза (Gallé et al., 2013; Sukhov et al. 2016), активацию дыхания (Gallé et al., 2015), продукцию стрессовых гормонов (Farmer et al., 2020; Ladeynova et al., 2020) и другие физиологические ответы. Можно ожидать, что такие изменения должны сопровождаться изменениям оптических свойств листа, что может быть использовано в качестве основы для разработки новых методов мониторинга сигнальных процессов у растений. В связи с этим, было проведено комплексное исследование влияния электрических сигналов (на примере, ВП) на индексы отражения листьев гороха. Эксперименты проводили на фиксированных в пространстве листьях.

Рисунок 3.10 показывает, что различия для RI между опытом и контролем (значения индексов за 5 мин до индукции ВП) отсутствовали перед ожогом листа. Индукция ВП локальным ожогом растения вызывала временное возрастание RI, которые были наиболее выраженными на 5 и 15 мин после ожога в небольшой спектральной области (около 550–570 нм для λ1 и 535-560 нм для λ2).



Рис. 3.10. Тепловые карты достоверности и направления различий индексов отражения (RI) между опытом и контролем во втором листе гороха перед ожогом первого зрелого листа и на различных временных интервалах после такого ожога. По осям отложены длины волн, на основе которых рассчитывали индексы отражения; оттенками синего отмечены достоверные снижения индексов в опыте, оттенками красного – достоверные возрастания. В качестве контроля использовали значения RI за 5 мин до ожога; ожог использовали в качестве стандартного индуктора ВП. Достоверность различий оценивали на основе Манн-Уитни U-теста, n=13.

Также можно отметить наличие крайне маленьких областей (размер сопоставим с одиночными пикселями), демонстрирующих значительное изменение RI после нанесения ожога и индукции ВП. Например, было выявлено, что меняется RI(680, 675); измеренный отраженный свет на этих длинах волн может дополнительно включать флуоресценцию хлорофилла (Kalaji et al., 2014), что может быть одним из механизмов изменений.

Далее были исследованы тепловые карты различий в величине изменений индексов отражения (Δ RI) в опыте (с индукций ВП ожогом) и контроле (перед индукцией) (Puc.3.11). Такой вариант анализа был выбран в связи с тем, что изменения индексов отражения могут быть более чувствительными к кратковременным действиям неблагоприятных факторов, чем их абсолютные значения (Soudani et al., 2014; Zhang et al., 2016). В частности, использование Δ RI позволяет уменьшить индивидуальную вариабельность исходных значений RI у различных растений и, тем самым, уменьшить ошибку измеренных значений.



Рис. 3.11. Тепловые карты достоверности и направления различий изменений индексов отражения (Δ RI) между опытом и контролем во втором листе гороха перед ожогом первого зрелого листа и на различных временных интервалах после такого ожога. По осям отложены длины волн, на основе которых рассчитывали Δ RI; оттенками синего отмечены достоверные снижения Δ RI в опыте, оттенками красного – достоверные возрастания. Δ RI рассчитывали как разность между RI в текущий момент времени и контрольным RI за 5 мин до ожога; ожог использовали в качестве стандартного индуктора ВП. Достоверность различий оценивали на основе Манн-Уитни U-теста, n=13. На первой тепловой карте (за 15 мин до локального ожога и индукции ВП) были выявлены только отдельные пиксели, показывающие наличие отдельных Δ RI с достоверными различиями между опытом и контролем (Рис.3.11). При этом они были расположены довольно хаотично, за исключением нескольких пиксельных линий в нижней части рисунка, а также практически отсутствовали варианты с высоким значением различий (p < 0.001). Можно предполагать, что такие различия являются скорее кажущимися и могут быть вызваны случайными изменениями в спектрах и ошибками измерения.

Индукция ВП локальным ожогом первого зрелого листа вызвала значительные изменения Δ RI во втором зрелом листа (Рис.3.11). В частности, наблюдались значительное возрастание Δ RI (например, при приблизительно 540–625 нм для λ 1 и 520–560 нм для λ 2), а также снижение Δ RI (например, при приблизительно 510–560 нм для λ 1 и 450–520 нм для λ 2). При этом наибольший эффект наблюдался через 5 и 15 мин после ожога (доля Δ RI, имеющих различия с достоверностью *p* < 0.001, составляла 8–9% от общего количества Δ RI). Через 35 и 45 минут после ожога доля Δ RI, имеющих различия с достоверностью *p* < 0.001, сиизилась до 4-5%.

Таким образом, полученные результаты показывают, что индукция электрических сигналов локальным ожогом вызывала значительные изменения ΔRI и слабо влияла на величины RI. Наиболее вероятным механизмом изменения оптических свойств при индукции ВП является снижение фотосинтетической активности. Известно, что максимумы поглощения света хлорофиллом располагаются в синей и красной областях спектра, а максимум флуоресценции фотосистемы II наблюдается при 685 нм (Porcar-Castell et al., 2014; Ките et al., 2018). Потенциально, отрицательные изменения ΔRI в красной области спектра (Рис. 3.11) показывают вызванное ВП снижение флуоресценции хлорофилла. Это хорошо согласуется с работами, показавшими, что развитие нефотохимического тушения может быть стимулировано электрическими сигналами (Pavlovič et al., 2011; Sukhov et al., 2014, 2015). Сильная отрицательная корреляция между RI (или Δ RI) и NPQ (или Δ NPQ) в красной области спектра также подтверждает эту гипотезу (данные не приведены). Следует отметить, что возрастание NPQ, вызванное ВП, также связано с закислением просвета хлоропластов (Sukhov et al., 2016; Sukhov, 2016), что объясняет значительные изменения RI и ΔRI в желто-зеленой области спектра и позволяет предсказать влияние электрических сигналов на фотохимический индекс отражения и близкие к нему индексы.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИМЕНИМОСТИ ФОТОХИМИЧЕСКОГО ИНДЕКСА ОТРАЖЕНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ И АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ ЕГО ИЗМЕНЕНИЙ

Фотохимический индекс отражения (PRI) является одним из распространенных пигментных индексов, используемых для дистанционного мониторинга состояния растений (Xue, Su 2017). Развитие его изменений связывают с переходами в ксантофилловом цикле (Gamon et al., 1992; Peñuelas et al., 1995a; Filella et al., 1996, 2009). В типичном случае PRI рассчитывается на основе интенсивностей отраженного света на длинах волн 531 нм и 570 нм (Gamon et al., 1997; Zhang et al., 2016). Использование PRI имеет большой потенциал для оценки биохимических изменений у растения и активности физиологических процессов. В частности, PRI может быть использован для оценки изменений пигментного состава (например, соотношение хлорофиллов или соотношение каротиноидов и хлорофиллов) (Filella et al., 2009; Hernández-Clemente et al., 2012; Harris et al., 2016; Kováč et al., 2013), выброса изопренов растениями (Peñuelas et al., 2013; Harris et al., 2016; Balzarolo et al., 2018), активности процессов световой и темновой стадии фотосинтеза (Zinnert et al., 2012; Stratoulias et al., 2015), эффективности использования света в фотосинтетических процессах (Cheng et al., 2013; Wu et al., 2015; Harris et al., 2016) и др. В то же время сила связи PRI с показателями состояния растений может сильно варьировать (Zhang et al., 2016), а механизмы его быстрых изменений требуют дальнейших исследований. Вследствие этого изучение путей повышения эффективности использования PRI и анализ возможных путей развития его изменений при действии неблагоприятных факторов стали основными задачами следующего этапа работы.

4.1. Мета-анализ литературных данных о влиянии условий измерения на корреляцию между фотохимическим индексом отражения и активностью фотосинтетических процессов

На первом этапе этого блока исследований, был проведен мета-анализ литературных данных, посвященный оценке влияния условий измерения фотохимического индекса отражения на связь PRI с фотосинтетическими параметрами. При этом, в частности, анализировалось влияние масштаба измерения и источника освещения на силу линейной связи между фотохимическим индексом отражения и параметрами фотосинтетической активности, включая эффективный квантовый выход фотохимических реакций фотосистемы II (YII), нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла a (NPQ), эффективность использования света при ассимиляции CO₂ (LUE).

Было показано, что пространственный масштаб измерения фотохимического индекса отражения мог сильно влиять на его итоговую связь с фотосинтетическими показателями. Так, коэффициент корреляции между PRI и YII или между PRI и NPQ был выше при измерении фотосинтетических параметров в масштабе растительного покрова и ниже при измерениях с использованием отдельных листьев (Таблица 4.1). В то же время, для LUE результат был обратным: измерения на уровне отдельных листьев обеспечивали более сильную линейную связь с PRI.

Таблица 4.1

наиденные на бенове метаанализа литературных данных					
Условия измерения		Коэффициенты корреляции			
		YII	NPQ	LUE	
Масштаб	Лист	$0.58{\pm}0.05$	-0.40 ± 0.08	0.77±0.03	
измерения	Растительный покров	0.72 ± 0.05	-0.77 ± 0.05	0.46 ± 0.08	
Источник	Солнечный свет	$0.50{\pm}0.08$	-0.41 ± 0.08	0.50 ± 0.07	
освещения	Искусственный свет	0.71±0.04	-0.65±0.11	0.75±0.04	

Коэффициенты корреляции Пирсона между параметрами активности фотосинтеза и PRI, найденные на основе метаанализа литературных данных

Можно предполагать, что увеличение масштаба измерения само по себе снижает вариабельность и шумы при регистрации PRI и параметров флуоресценции хлорофилла, что повышает силу их связи. В то же время измерение фотосинтетической ассимиляции углекислого газа (которая используется в качестве основы для расчета LUE) на уровне растительного покрова или кроны технически сложно и обычно опирается на результаты измерения отдельных листьев, что повышает вариабельность измеренного показателя. Кроме того, распределение света внутри растительного покрова является неоднородным (Song et al., 2017; Wu et al., 2018), что может отразиться на значениях LUE и дополнительно увеличить ошибку измерения.

Другим важным фактором, влияющим на связь между PRI и фотосинтетическими показателями, может быть «удаленность» друг от друга механизмов, лежащих в основе конкретных процессов. Так изменения в ксантофилловом цикле непосредственно влияют на динамику PRI (Gamon et al., 1992; Peñuelas et al., 1995a; Filella et al., 1996), на развитие NPQ и на активность использования света фотосистемой II, т. е. на YII (Jahns et

al., 2009; Kalaji et al., 2014; Ruban et al., 2016). В то же время активность ксантофиллового цикла и ассимиляции (и, соответственно, LUE) связаны через многие промежуточные процессы, вследствие чего связь между PRI и LUE может быть очень чувствительна к действию внешних факторов.

Также мета-анализ показал, что источник освещения, используемый при измерении, может быть еще одним фактором, влияющим на силу связи между фотохимическим индексом отражения и параметрами фотосинтеза. Было выявлено, что при измерении в условиях искусственного освещения линейная связь между PRI и параметрами фотосинтеза была сильнее, чем в случае измерений при естественном (солнечном) освещении (Таблица 4.1); эффект был сильно выражен для всех исследованных фотосинтетических параметров. Можно предположить, что использование искусственного света для освещения растений в условиях измерения PRI снижало влияние на измерения ряда факторов, включая смещение спектра (вследствие переотражения солнечного света и различного времени суток при измерении) и флуктуации интенсивности освещения, которые могли искажать измерения. Как следствие, применение искусственного освещения делало измерения более стабильными и тем самым способствовало более сильными связям между PRI и фотосинтетическими показателями.

4.2. Разработка нового метода регистрации фотохимического индекса отражения с использованием активного освещения листа вспышками желтозеленого измерительного света

Влияния фонового освещения на результаты измерения индексов отражения является важной проблемой дистанционного мониторинга, снижающей его эффективность (Agapiou et al., 2011; Xue, Su 2017). Нами был разработан новый метод измерения PRI с использованием вспышек жёлто-зелёного измерительного света (GYL). Для исследования изменений PRI использовали принцип, основанный на расчете разности между интенсивностью отраженного света на фоне импульса жёлто-зеленого измерительного света (на объект одновременно падал фоновый свет и GYL) и интенсивностью отраженного света без такого импульса (на объект падал только фоновый свет).

На первом этапе этого блока исследований использовали спектрометр S100 и источник жёлто-зелёного света. Прежде всего была исследована возможность использования импульсов GYL для исключения ошибки, связанной с изменением интенсивности
фонового освещения (на примере красного актиничного света с интенсивностями 131, 344, 830 и 1599 µмоль м⁻² с⁻¹). Исследование проводили на горохе, пшенице и тыкве. Отражение света измеряли во время импульса GYL и без него; анализировали абсолютные величины отраженного света на 570 и 531 нм во время GYL (R_{570} и R_{531}) и разности между такими величинами в условиях импульса GYL и без него (ΔR_{570} и ΔR_{531}). Общая схема измерения приведена на рисунке 4.1.



Рис.4.1. Схема освещения растений импульсами желто-зеленого света (GYL). Импульсы GYL генерировались через 20 с после включения красного актиничного света. AL – красный актиничный свет (который может отсутствовать), ML – измерительный свет, SP – насыщающие вспышки; RL – отраженный свет; R₅₇₀ и R₅₃₁ – интенсивность отраженного света растениями на длинах волн 570 и 531 нм. Δ R₅₇₀ и Δ R₅₃₁ рассчитывали как разности интенсивностей отраженного света на 570 и 531 нм во время импульса GYL и без него.

Было показано, что актиничный свет с интенсивностью 131 и 344 µмоль м⁻² с⁻¹ практически не влиял на R_{570} и ΔR_{570} (Рис.4.2). Освещение растений актиничным светом интенсивностью 830 и 1599 µмоль м⁻² с⁻¹ значительно увеличивало R_{570} у всех исследованных видов, что должно было приводить к существенному искажению при расчете PRI. Напротив, величина ΔR_{570} оставалась практически неизменной у всех исследованных объектов. Исследование отраженного света на длине волны 531 нм не выявило существенных различий между R_{531} и ΔR_{531} , что, по-видимому, объясняется сильным снижением интенсивности красного актиничного света в этом спектральном диапазоне.



Рис.4.2. Отраженный свет на 570 и 531 нм в условиях освещения растений красным актиничным светом (PAR) у гороха (n=6) (a), пшеницы (n=6) (б) и тыквы (n=6) (в). Импульсы GYL генерировались через 20 с после включения красного актиничного света. За 100% принимали отражение в условиях отсутствия красного актиничного света. R₅₇₀ и R₅₃₁ – интенсивность отраженного света растениями на длинах волн 570 и 531 нм во время одновременного действия GYL и красного актиничного света. ΔR_{570} и ΔR_{531} – разности интенсивностей отраженного света на 570 и 531 нм во время импульса GYL и без него. *, различия между R₅₇₀ (R₅₃₁) и ΔR_{570} (ΔR_{531}) достоверны (p < 0.05).

Таким образом, измерение отраженного света с использованием импульсов GYL и расчет разности отражения во время импульса GYL и без него, позволяет практически полностью устранить искажающее влияние фонового актиничного света на измерение фотохимического индекса отражения. Полученный результат создает основу для измерения PRI в условиях сложного характера освещения (например, несколько источников

освещения в условиях защищенного грунта или дополнительное освещение растения солнечным светом, отраженным от окружающих объектов в условиях естественного освещения). В настоящее время такие проблемы частично решаются периодическим использованием калибровочного стандарта во время измерения; однако, это усложняет процесс измерения, а в случае сложной структуры кроны исследуемых растений (листья расположены под разными углами к источнику освещения) корректное использование калибровочных стандартов практически невозможно при достаточно малом масштабе измерений (при котором могут быть выявлены отдельные листья).

На основе предложенного метода измерения PRI была разработана (совместно с ИПФ РАН) новая система измерения пространственного распределения фотохимического индекса отражения по растению, использующая кратковременные измерительные импульсы GYL (система PRI-имиджинга) (Рис. 4.3).



Рис.4.3. Фотография разработанной системы пространственного измерения PRI использующей импульсы жёлто-зелёного измерительного света (система PRI-имиджинга) (а) и блок-схема системы PRI-имиджинга (б). Система включала в себя желто-зеленые светодиоды (1), светоделительную пластинку (2), узкополосные интерференционные светофильтры с максимумами пропускания на 575 нм (3) и 530 нм (4), монохроматическая ССD-камера с объективом (5, 6), USB-хаб, ARDUINO UNO (8), источник тока для светодиода (9), источник питания (10) и ПК (11). Подробное описание блок-схема разработанной системы показана в патенте (патент № 2 746 690 С1).

На рисунке 4.3 показаны фотография и блок схема разработанной системы. При функционировании системы импульсы света генерируются желто-зелеными светодиодами, расположенными по бокам от окна регистратора. Отраженный растением свет проходит в окно прибора и попадает на светоделитель, разделяющий изображение на два световых потока. Один из световых потоков проходит через узкополосный 530 нм фильтр, а другое – через 575 нм фильтра; далее изображения регистрируются двумя монохроматическими ССD камерами. На рисунке 4.4 представлена схема измерительного цикла разработанной системы PRI-имиджинга с постоянной (слева) и контролируемой (справа) длительностью освещения растения GYL. В дальнейших исследованиях (см. раздел 4.3.1. и 4.3.5.) была использована именно постоянная длительность освещения растения GYL, которая составляла 18 мс, что позволяло минимизировать воздействие измерительного желто-зеленого света на исследуемые растительные объекты.

4.3. Исследование влияния освещения, засухи и повышенной температуры на фотохимический индекс отражения

4.3.1. Исследование влияния интенсивности освещения на фотохимический индекс отражения листьев растений

На следующем этапе было выполнено исследования влияния интенсивности освещения на PRI, включая анализ связи фотохимического индекса отражения с фотосинтетическими показателями и прежде всего – с NPQ_F, показывающим величину энергозависимого компонента нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла. NPQ_F был среди других фотосинтетических показателей в связи с тем, что его формирование обусловлено закислениям люмена в условиях освещения (Ruban, 2016), а именно закисление люмена рассматривается как основная причина индукции изменений фотохимического индекса отражения (Zhang et al., 2016); при этом конкретными механизмами индукции могут быть как pH-зависимая реакция деэпоксидирования в ксантофилловом цикле (Peñuelas et al., 1995a; Filella et al., 1996), так и pH-зависимое сжатие хлоропластов (Evain et al., 2004). Помимо абсолютной величины PRI, в этом блоке работ также исследовались светоиндуцированные изменения фотохимического индекса отражения (Δ PRI), так как такие изменения могут оказаться более чувствительны к изменению фотосинтетических процессов (Kováč et al., 2018, 2020). Исследования были выполнены на растения гороха, пшеницы и тыквы.



Рис.4.4. Схема измерительного цикла разработанной системы PRI-имиджинга. Слева представлен режим измерения с постоянной длительностью импульсов GYL (18 мс), слева – режим измерения с контролируемой длительностью освещения растения GYL. В диссертационной работе использовался только режим с постоянной длительностью импульсов GYL. Длительность экспозиции камер во всех случаях составляла 10 мс. Прежде всего были проведены исследования влияния интенсивности освещения на PRI, который определяли на основании измерения спектров отражения у фиксированных в пространстве листьях растений; при этом схема измерения соответствовала рисунку 4.1 и использовались длительные импульсы желто-зеленого измерительного света (GYL). Параллельно осуществлялись измерения фотосинтетических показателей с использованием Dual-PAM-100.

Было показано (Рис.4.5), что световые кривые NPQ_F, PRI и ΔPRI имели качественно близкий характер у всех трех исследованных видов растений: с возрастанием интенсивности освещения происходило увеличение быстро-релаксирующей компоненты нефотохимического тушения и сдвиг в отрицательную область величины фотохимического индекса отражения и его светоиндуцированных изменений. В то же время, стандартные отклонения среднего у PRI были значительно выше, нежели аналогичные отклонения у ΔPRI, что показывает большую точность измерений при использовании светоиндуцированных изменений индекса.

Для более детального исследования связи NPQ_F с PRI и ΔPRI были построены диаграммы рассеяния между значениями этих величин в индивидуальных растениях (Puc. 4.6). Было показано, что связь между NPQ_F и PRI была невысокой для всех исследованных видов растений, а также – для общего массива экспериментальных точек, включающих в себя параметры растений различных видов; так максимальная величина коэффициента детерминации для линейной функции, связывающей эти величины составляла 0.29 (пшеница). Напротив, линейная связь между NPQ_F и ΔPRI была сильной и достоверной: коэффициент детерминации для такой связи был не менее 0.78 для отдельных видов растений и равнялся 0.72 для всего массива экспериментальных точек.

Аналогичные исследования, проведенные на горохе с использованием разработанной системы PRI-имиджинга и стандартной системы PAM-имиджинга Open Fluor-Cam FC 800-O/1010, подтвердили полученные результаты: увеличение интенсивности освещения приводило к возрастанию NPQ_F и сдвигу в отрицательную область PRI и ΔPRI (Puc. 4.7), параметры фотохимического индекса отражения были сильно связаны с NPQ_F (Puc. 4.8). Важно отметить, что стандартные отклонения PRI были значительно выше нежели аналогичные величины для ΔPRI, что подтверждает большую точность использования светоиндуцированных изменений фотохимического индекса отражения для выявления изменений.



Рис.4.5. Световые кривые для быстро-релаксирующей компоненты нефотохиммического тушения (NPQ_F), фотохимического индекса отражения (PRI) и его светоиндуцированного изменения (ΔPRI) у гороха (а), пшеницы (б) и тыквы (в) (*n*=6). Измерения осуществлялись с использованием спектрометра S100 и PAM-флуориметра Dual-PAM-100.



Рис.4.6. Диаграммы рассеяния между NPQ_F и PRI (слева) и NPQ_F и Δ PRI (справа) у гороха (*n*=30) (а), пшеницы (*n*=30) (б), тыквы (*n*=30) (в), в случае совмещения данных для всех трёх видов растений (*n*=90) (г). Измерения осуществлялись с использованием спектрометра S100 и PAM-флуориметра Dual-PAM-100.



Рис.4.7. Световые кривые для быстро-релаксирующей компоненты нефотохиммического тушения (NPQ_F) (а), фотохимического индекса отражения (PRI) (б) и его светоиндуцированного изменения (Δ PRI) (в) у гороха (*n*=16). Измерения осуществлялись с использованием разработанной системы PRI-имиджинга и системы PAM-имиджинга Open FluorCam FC 800-O/1010.



Рис.4.8. Диаграммы рассеяния между NPQ_F и PRI (а) и NPQ_F и Δ PRI (б) у гороха. Измерения осуществлялись с использованием разработанной системы PRI-имиджинга и системы PAM-имиджинга Open FluorCam FC 800-O/1010 (*n*=16).

Таким образом, полученные результаты подтверждают большую эффективность применения светоиндуцированных изменений фотохимического индекса отражения для выявления изменений PRI при действии освещения различной интенсивности, что согласуется с рядом работ, показывающих большую эффективность использования Δ PRI для оценки состояния растений (Hmimina et al., 2014; Magney et al., 2016; Kováč et al., 2018, 2020; Vilfan et al., 2018). Еще одним важным результатом является выявление связи фотохимического индекса отражения с NPQ_F, показывающим энергозависимый компонент нефотохимического тушения флуоресценции (Maxwell, Johnson, 2000; Müller et al., 2001). Несмотря на то, что связь параметров фотохимического индекса отражения с величиной этого компонента NPQ является вероятной, большинство исследований посвящено анализу связей PRI с общей величиной NPQ. Наконец, результаты этого блока исследований показывают, что разработанная система PRI-имиджинга может быть эффективна использована для исследования фотохимического индекса отражения у растений.

4.3.2. Исследование влияния длительности освещения на связь фотохимического индекса отражения с показателями фотосинтеза

Начало освещения сопровождается значительными переходными процессами в фотосинтетическом аппарате растений (Kalaji et al., 2014). Можно предполагать, что сила связи между PRI и фотосинтетическими показателями будет зависеть от длительности освещения растения. Учитывая, что флуктуации интенсивности освещения являются достаточно типичным явлением в естественных условиях, анализ влияния длительности освещения на связь фотохимического индекса отражения с параметрами фотосинтеза представляется важной задачей.

В эксперименте использовали растения гороха с фиксированными в пространстве листьями, спектральные характеристики которых исследовали с использованием спектрометра S-100, а фотосинтетические показатели (YII, YI и NPQ) – с использованием РАМ-флуориметра Dual-PAM-100. Было показано, что основные изменения фотосинтетических параметров происходили в течение 1 минуты после включения освещения, а на 2-3-ю минуту наблюдалась стабилизация величины таких параметров (Рис.4.9а, б). В случае PRI, его снижение происходило в течение 3 минут после включения света, а дальше величина индекса выходила на плато (Рис.4.9в).



(B)

Рис.4.9. Динамики изменений эффективного квантового выхода фотохимических реакций фотосистемы II (YII) и фотосистемы I (YI) (а), нефотохимического тушения (NPQ) (б) и PRI (в) после включения освещения (0 с) на примере гороха (*n*=6).

Далее было проведено исследование влияния длительности освещения после включения света силу линейной связи между показателями фотосинтеза и PRI (Puc.4.10), которую оценивали по величине коэффициента корреляции Пирсона между этими величинами. Было показано, что коэффициент корреляция между PRI и фотосинтетическими показателями (YII, YI и NPQ) возрастал по мере увеличения длительности освещения и становился значимым, начиная с 1-2-й минуты освещения.



Рис.4.10. Зависимость коэффициента линейной корреляции между фотосинтетическими параметрами от времени после начала освещения листа растения у гороха (*n*=6). а – зависимость корреляции для YI и YII, б – зависимость корреляции для NPQ.

Известно, что наибольшие изменения pH в хлоропластах наблюдаются в первые минуты после начала освещения растения (Zaks et al., 2012). Они могут быть связаны с необходимостью некоторого времени для активации ферментов цикла Кальвина (Бухов, 2004) и H⁺-ATP-синтазы тилакоидной мембраны хлоропластов (Hisabori et al., 2002) после длительного затемнения, что хорошо согласуется с возрастанием NPQ в течение 2 мин после включение света в наших экспериментах (Рис.4.9б), которое, по-видимому, связано с формированием энергозависимой компоненты (NPQF) нефотохимического тушения. Важно отметить, что такое быстрое возрастание NPQ не связано с переходами в цикле ксантофиллов, так как такие переходы требует от нескольких мин – до десятков мин освещения (Nilkens et al., 2010; Kress, Jahns, 2017); для гороха такие переходы требуют около 10 мин. Таким образом, сопоставление наших результатов (наличие быстрых изменений PRI в пределах первых минут освещения) и данных литературы позволяет предположить, что такие быстрые изменения PRI после включения света слабо связаны с переходами в ксантофилловом цикле, а обусловлены другим механизмом, которые также связан с изменениями pH в люмене хлоропластов. В качестве такого механизма может выступать быстрое сжатие хлоропластов (Evain et al., 2004).

4.3.3. Исследование связи фотохимического индекса отражения с изменениями рН в хлоропластах при действии света

Для дополнительной проверки связи изменений PRI и закисления люмена хлоропластов была исследована связь изменения фотохимического индекса отражения и изменения величины light scattering (LS) (Schreiber, Klughammer, 2008), величина которого рассматривается как показатель pH в люмене хлоропластов.

Эксперименты проводили на фиксированных в пространстве листьях гороха. Отражение света растениями измеряли при помощи спектрометра S-100, LS оценивали с использованием модуля P515/535. Было показано, что включение света индуцировало возрастание LS в течение 2 минут, далее изменения были незначительными (Рис.4.11а). Такой результат хорошо согласуется с данными литературы, так как изменения LS в течение первых минут освещения могут быть связаны с генерацией градиента pH через тилакоидную мембрану хлоропластов и снижением pH люмена (Deamer et al., 1967; Heber, 1969; Schreiber, Klughammer, 2008).

Исследование величины фотохимического индекса отражения не выявило достоверных различия PRI в ходе освещения листьев (Рис.4.11б). Можно, однако, предположить, что такое отсутствие изменений связано прежде всего с высокой погрешностью измерения, обусловленной индивидуальной вариабельность растений. Действительно, анализ ΔPRI показал его достоверное снижение в течение 2-х минут освещении растения (Рис.4.11в), что хорошо согласуется с динамикой LS (Рис.4.11а).



Рис.4.11. Динамики изменений LS (a), PRI (б) и Δ PRI (в) у гороха после включении света (0 с) (*n*=11).

Далее был проведён корреляционный анализ связи величин PRI и ΔPRI с LS. Анализ был выполнен для двух временных интервалов: (i) первые 2 минуты после включения света, так как изменения LS в этом временном диапазоне связаны, прежде всего, с изменениями pH люмена, и (ii) 3–10я минуты освещения, на которых стабилизируется величина LS (что, по-видимому, показывает стабилизацию pH в люмене), но ΔPRI продолжает незначительно меняться.

Рисунок 4.12а показывает, что связь между PRI и LS была слабой в течение первых 2-х минут освещения; однако, на этом же временном интервале между ΔPRI и LS была выявлена сильная отрицательная корреляция (Puc.4.12б). В то же время изменения показателей были совершенно не связаны на временном диапазоне 3–10 мин после включения света (Puc.4.12в, г). Полученные результаты подтверждают важную роль быстрых изменений pH люмена на свету в формировании изменений PRI.



Рис.4.12. Диаграммы рассеяния между фотохимическим индексом отражения и величиной LS на примере гороха. Связь между PRI и LS была проанализирована для данных с 0й по 2й минуту (n=33) (а) и с 3й по 10ю минуту освещения растений (n=108) (в); связь между Δ PRI и LS для данных с 0 по 2 минуту (n=33) (б) и с 3 по 10 минуту освещения растений (n=108) (г).

4.3.4. Исследование модифицированных фотохимических индексов отражения и их связи с параметрами фотосистем I и II

Известно, что изменения фотохимического индекса отражения связаны с несколькими процессами, развитие которых характеризуется различными временами. В частности, PRI может изменяться в течение длительного времени (от часов до дней и сезонов), но также могут наблюдаться быстрые изменения PRI (1–2 минуты или даже несколько секунд). Медленные изменения PRI связаны с изменениями в величине общего пула ксантофиллов и сдвигами соотношения хлорофиллов и каротиноидов (Hernández-Clemente et al., 2012; Harris et al., 2016). Более быстрыми являются изменения PRI, обусловленные переходными процессами в цикле ксантофиллов (Gamon et al., 1992), так как активация ксантофиллового цикла происходит в течение приблизительно 10 минут и более (Nilkens et al., 2010; Kress, Jahns, 2017). Еще более быстрые изменения PRI (в пределах нескольких секунд) могут обусловлены сжатием хлоропластов, которое вызвано закислением люмена (Evain et al., 2004). Наконец, нельзя исключать возможность участия в изменениях PRI сверхбыстрых процессов (десятки мс), обусловленных развитием электрохимического сдвига в поглощении света в зеленом диапазоне, который обусловлен формированием потенциала на тилакоидной мембране хлоропластов в условиях освещения и активации электрон-транспортной цепи (Schreiber, Klughammer, 2008).

Важно отметить, что описанные механизмы изменения спектральных характеристик растения могут приводить к сдвигам спектров отражения с различными спектральными максимумами. Так максимальные изменения отражения, связанные с переходами в цикле ксантофиллов наблюдаются на 526 нм (Gamon et al., 1997), максимум изменения поглощения и отражения света, связанный со сжатием хлоропластов, наблюдается приблизительно на 531-540 нм (Gamon et al., 1997; Schreiber, Klughammer, 2008), а изменения поглощения света вследствие электрохромного сдвига имеют максимум на 515-520 нм (Schreiber, Klughammer, 2008).

Различные механизмы изменения спектров отражения листа в зеленой области могут в различной степени зависеть от фотосинтетических процессов, т. е. сдвиг соотношения различных механизмов формирования таких изменений может как улучшить, так и ухудшить чувствительность оценки состояния растений на основании индексов отражения.

Такой сдвиг может быть достигнут путем применения модифицированных PRI, у которые сдвинута измерительная длина волны; такие индексы могут оказаться более или менее эффективны для выявления фотосинтетических изменений по сравнение с типичным PRI. В связи с этим, были исследованы модифицированные фотохимические индексы отражения, в которых основная длина волны была заменена на варианты с 515, 525, 535, 545 и 555 нм. Для этих индексов было проведено исследование их связи с по-казателями активности фотосистем II и I, а также – с величинами быстро- и медленно-релаксирующих компонент индексов при разной интенсивности освещения. Эксперименты проводили на фиксированных в пространстве листьях растений гороха, с использованием спектрометра S100 и PAM-флуориметра Dual-PAM-100.

Было показано, что при увеличении интенсивности актиничного света значения YII, qP, YI и YNA уменьшались (Рис.4.13а-г), а значения YNA и NPQ возрастали (Рис.4.13д, е). Также следует отметить, что в условиях освещения растений светом 344, 830 и 1599 µмоль M^{-2} с⁻¹ происходило насыщение величины YNA (Рис.4.13г); подобные эффект не был выявлен для других фотосинтетических параметров.

Аналогичные кривые были исследованы для светоиндуцированных изменений у модифицированных фотохимических индексов отражения, включая PRI(515, 570), PRI(525, 570), PRI(535, 570), PRI(545, 570) и PRI(555, 570), и у типичного PRI (ΔPRI(531, 570)). Следует отметить, что в этом блоке работ были исследованы только ΔPRI (как типичные, так и модифицированные), а сами величины PRI не исследовались, так как на предыдущем этапе исследования была показана большая эффективность использования таких изменений.

Было показано (Рис.4.14), что увеличение интенсивности освещения индуцировало изменения всех исследованных индексов. Однако в их динамике наблюдались некоторые различия. Так, снижение Δ PRI(515, 570) и Δ PRI(555, 570) было слабо выражено и наблюдалось только при высокой интенсивности освещения (1599 µмоль м⁻² c⁻¹). В то же время, для остальных индексов изменения можно было наблюдать и при более низких значениях интенсивности света. Другим важным отличием была различная динамика темновой релаксации изменений: такая релаксация практически отсутствовала для Δ PRI(515, 570) и Δ PRI(525, 570) и была максимально выражена для Δ PRI(545, 570).

Исследование силы линейной связи между светоиндуцированными изменениями модифицированных фотохимических индексов отражения и параметрами фотосинтеза показало (Puc.4.15), что связь между ними была высокой и достоверной в случае Δ PRI(535, 570), Δ PRI(545, 570) и Δ PRI(555, 570), в то время как для Δ PRI(515, 570) и Δ PRI(525, 570) такая связь была слабой. Важно отметить, что одним из сильно связанных с «длинноволновыми» модифицированными PRI показателей являлся квантовый выход фотохимических реакций фотосистемы I (YI). Этот результат представляется интересным, так в литературе была преимущественно исследована связь PRI с показателями фотосистемы II (Garbulsky et al., 2011; Zhang et al., 2016); полученный же результат показывает, что фотохимические индекс отражения может быть использован для оценки процессов, протекающих на уровне фотосистемы I.



Рис.4.13. Динамики изменений фотосинтетических параметров в условиях освещения растений красным актиничным светом PAR с разными интенсивностями, включая (а) YI, (б) YII, (в) YND, (г) YNA, (д) NPQ и (е) qP, измеренные на листьях гороха (n=6).



Рис.4.14. Динамики величины светоиндуцированных изменений типичного и модифицированных фотохимических индексов отражения в условиях освещения растений красным актиничным светом PAR с разными интенсивностями, включая (a) Δ PRI(515, 570), (б) Δ PRI(525, 570), (в) Δ PRI(531, 570), (г) Δ PRI(535, 570), (д) Δ PRI(545, 570) и (е) Δ PRI(555, 570), измеренные на листьях гороха (*n*=6) с использованием импульсов GYL.











Рис.4.15. Коэффициенты линейной детерминации R² между параметрами активности фотосинтеза и индексам отражения, включая (а) Δ PRI(515, 570), (б) Δ PRI(525, 570), (в) Δ PRI(531, 570), (г) Δ PRI(535, 570), (д) Δ PRI(545, 570) и (е) Δ PRI(555, 570). *, показывает статистически значимую линейную корреляцию между величинами (p < 0.05).

Выявленная сильная связь фотохимических индексов отражения с эффективным квантовым выходом фотохимических реакций фотосистемы I может быть опосредована участием циклического потока вокруг этой фотосистемы и формированием градиента pH (Miyake, Yokota, 2001; Cardona et al., 2018), который имеет важное значение для активации механизмов фотохимического индекса (Gamon et al., 1997).

Слабая связь ΔPRI(515, 570) и ΔPRI(525, 570) с параметрами фотосинтеза может быть обусловлена медленным развитием переходных процессов в ксантофилловом цикле на свету, что может уменьшать сопряженность изменений этих модифицированных фотохимических индексов отражения и изменений фотосинтетических процессов.

Наконец, следует отметить, что связь между YNA и фотохимическими индексами отражения была слабой во всех исследованных вариантах (Рис.4.15). Можно предположить, что такая слабая связь была обусловлена инактивацией ферредоксин-НАДФ редуктазой в темноте и ее медленной реактивацией на свету (Benz et al., 2010; Mulo, 2011). Возможно, вследствие этого процесса световая зависимость YNA достигала насыщения уже при 344 µмоль м⁻² с⁻¹, в отличие от остальных фотосинтетических параметров (Рис.4.13) и фотохимических индексов отражения (Рис.4.14). Таким образом, можно предположить, что механизм регуляции потока электронов через акцепторную сторону фотосистемы I может снизить взаимосвязь между YNA и светоиндуцированными изменениями модифицированных фотохимических индексов отражения.

Далее было проведен анализ соотношения быстро- и медленно-релаксирующие компонент у модифицированных индексов отражения; анализ проводился в условиях различной интенсивности освещения растений (Рис.4.16). Было показано, что при интенсивности света 131 и 344 µмоль м⁻² c⁻¹ обе компоненты были слабо выражены, что затрудняло их анализ. В то же время, при более высоких интенсивностях красного актиничного света (830 и 1599 µмоль м⁻² c⁻¹) амплитуды таких компонент значительно возрастали, что позволило исследовать их соотношение у различных модификаций фотохимического индекса отражения. При этом максимальные величины быстрорелаксирующей компоненты наблюдались для Δ PRI(535, 570) и Δ PRI(545, 570), что подтверждает связь таких индексов с быстрым сжатием/расширением хлоропластов в условиях изменения интенсивности освещения. Медленно-релаксирующая компонента имела максимальные значения у Δ PRI(515, 570) и Δ PRI(525, 570), что подтверждает связь токих индексов с относительно медленными переходами в ксантофилловом цикле.



Рис.4.16. Зависимость быстро- и медленно-релаксирующей компонент от измерительной длины волны модифицированных индексов отражения при освещении гороха красным актиничным светом интенсивностью 131 µмоль м⁻² c⁻¹ (a), 344 µмоль м⁻² c⁻¹ (б), 830 µмоль м⁻² c⁻¹ (в), 1599 µмоль м⁻² c⁻¹ (г) (*n*=6).

Таким образом, было показано, что вклад быстро- и медленно-релаксирующих компонент изменения индексов отличается для PRI(515, 570), PRI(525, 570), PRI(531, 570), PRI(535, 570), PRI(545, 570) и PRI(555, 570). Потенциально, такой различный вклад может влиять на чувствительность индекса к действию неблагоприятного фактора, а значит модифицированные PRI могут стать основой для дальнейшего развития методов дистанционного мониторинга состояния растений при действии на них неблагоприятных факторов.

4.3.5. Исследование изменений фотохимического индекса отражения в условиях водного дефицита и повышенной температуры

На следующем этапе работ было выполнено исследование влияния водного дефицита и теплового шока на фотохимический индекс отражения. Эксперименты проводили на растениях гороха. Измерения проводили на фиксированных в плоскости измерения листьях с использованием разработанной системы PRI-имиджинга; активность фотосинтеза оценивали с помощью системы PAM-имиджинга Open FluorCam FC. Было показано, что водный дефицит вызывал снижение NPQ_F, PRI и ΔPRI (Puc.4.17); достоверные различия наблюдались, начиная с 1 суток после индукции водного дефицита.



Рис.4.17. Динамики изменений энергозависимой компоненты нефотохимического тушения NPQ_F (a), фотохимического индекса отражения PRI (б) и его светоиндеуцированных изменений Δ PRI (в) в условиях кратковременного водного дефицита у гороха (*n*=12). *, *p* < 0.05.

Далее было показано, что между NPQ_F и PRI (Рис.4.18а) и NPQ_F и Δ PRI (Рис.4.18б) наблюдалась сильная линейная связь, коэффициенты детерминации для линейных регрессий составляли 0.683 и 0.7718, соответственно. Следует отметить, что в случае, когда при измерении отраженного света не использовали импульсы GYL, коэффициент детерминации линейной регрессии между NPQ_F и PRI составил 0.24, а между NPQ_F и Δ PRI 0.68 (данные не приведены). Это ещё раз подтверждает эффективность использования импульсов измерительного желто-зеленого света для измерения фотохимического индекса отражения у растений.



Рис.4.18. Диаграммы рассеяния между NPQ_F и PRI (а) и NPQ_F и ΔPRI (б) у гороха в условиях кратковременного водного дефицита.

Повышенная температура является еще одним важным фактором окружающей среды, который часто сопровождает засуху. В связи с этим, далее было исследовано влияние повышенной температуры на растения гороха. Измерения фотосинтетических показателей и PRI проводили через 1 час и 1 сутки после нагрева растений (нагрев в течение 30 минут при температуре 46 °C); результаты таких измерений представлены на рисунке 4.19.



Рис.4.19. Изменение энергозависимой компоненты нефотохимического тушения NPQ_F (a), фотохимического индекса отражения PRI (б) и его светоиндеуцированных изменений Δ PRI (в) через 1 час и 1 день после теплового шока (нагрев в течение 30 минут при температуре 46 °C) у гороха (*n*=12). *, *p* < 0.05.

Было показано, что через 1 час после нагрева NPQ_F возрастал, а затем через 1 сутки снижался; однако, выявленные изменения были недостоверны (Рис.4.19а). Исследование PRI показало возрастание его величины через 1 час после нагрева и восстановление до контрольных значений через 1 сутки, изменения также были не достоверны (Рис.4.19б). Для ΔPRI, напротив, наблюдалось достоверное снижение через час после нагрева и возвращение к контрольным значениям через сутки (Рис.4.19в). Связь между NPQ_F и PRI была слабой, коэффициент детерминации для линейной регрессии между этими величинами составлял 0.1731 (Рис.4.20а). В случае, когда в экспериментах не использовали GYL коэффициент детерминации также был невысок и составлял 0.1 (данные не приведены).

Также следует отметить, что связь между NPQ_F и Δ PRI была сильной как в случае использования GYL (R²=0.8886) (Рис.4.20б), так и при отсутствии жёлто-зелёных импульсов (R²=0.7) (данные не приведены). Тем не менее, использование разработанного метода с импульсами измерительного желто-зеленого света позволяет добиться более высокой линейной связи между измеренными NPQ_F и Δ PRI.

Развитие фотохимического индекса отражения тесно связано с механизмами NPQ, в частности, его энергозависимой компоненты NPQ_F. Потенциальный механизм изменений нефотохимического тушения в условиях водного дефицита может быть связан с подавлением активности фотосистемы II (данные не приведены), а также с закрытием устьиц и снижением ассимиляции СО2. Оба этих процесса приводят к активации нефотохимического тушения, предотвращающего избыточное повреждение фотосинтетического аппарата (Zivcak et al., 2014; Eppel, Rachmilevitch, 2015; Wang et al., 2018). В частности, в экспериментах отмечается изменение NPQ_F, которое обычно связывают со быстрым смещением pH в хлоропластах (Porcar-Castell et al., 2014; Ruban, 2016). Дополнительным механизмом изменений NPQ может быть закисление, вызванное накоплением кислот в условиях водного дефицита (Fahad et al., 2017). Учитывая ключевую роль изменений pH при всех потенциальных механизмах и связь изменений PRI с закислением люмена хлоропластов (Evain et al. 2004), можно предположить, что именно эти изменения рН обеспечивают изменения фотохимического индекса отражения в этих условиях. В случае теплового воздействия, изменения PRI могут быть связаны с высокой чувствительностью темновой стадии фотосинтеза к нагреву: нагрев подавляет функционирование цикла Кальвина – нарушается выход протонов через Н⁺-АТФсинтазу тилакоидной мембраны – усиливается закисление люмена.

Таким образом, полученные результаты дополнительно подтвердили эффективность использования импульсов GYL для измерения фотохимического индекса отражения при действии на растения неблагоприятных факторов. Также стоит отметить выявленную более высокую эффективность использования светоиндуцированных изменений фотохимического индекса отражения (ΔPRI) для оценки воздействия неблагоприятного фактора, по сравнению с использованием собственно величины PRI, что хорошо согласуется с литературными данными (Kováč et al., 2018, 2020).



Рис.4.20. Диаграммы рассеяния между NPQ_F и PRI (а) и NPQ_F и Δ PRI (б) у гороха в условиях температурного шока (нагрев в течение 30 минут при температуре 46 °C).

4.4. Изменения фотохимического индекса отражения при локальном повреждении и индукции электрического сигнала у растений

Электрические сигналы растений играют важную роль у растений для активации защитных механизмов и перестройки метаболизма в ответ на действие различных факторов среды. В частности, происходит усиление продукции гормонов (Krausko et al., 2017; Farmer et al., 2020; Ladeynova et al., 2020), инактивация фотосинтеза (Gallé et al., 2013), активация дыхания (Gallé et al., 2015) и генов (Stanković, Davies, 1996; Mousavi et al., 2013), синтез ATP (Surova et al., 2016) и др. Важным результатом индукции электрических сигналов также является возникновение и распространение между компартментами сигнала pH (Sukhov et al., 2014, 2016). В ряде работ считается, что pH влияет на изменение оптических свойств и, в частности, на PRI (Gamon et al., 1997; Evain et al., 2004). Вследствие этого в следующем блоке работ мы исследовали влияние локального ожога, который наносили на листовую пластинку первого зрелого листа, и индуцированного им электрического сигнала (вариабельного потенциала) на величину фотохимического индекса отражения. Исследования проводили на растениях гороха. Спектры отражения фиксированных в пространстве листьев растений измеряли при помощи спектрометра S-100; фотосинтетическую активность оценивали с помощью флуориметра Dual-PAM-100. Измерения отраженного света и активности фотосинтеза проводили 2 и 4 листьях гороха.

Рисунок 4.21 показывает, что локальный ожог вызывал значительное возрастание NPQ, а также небольшое снижение YII и YI во 2-м листе, который оставался интактным (Рис.4.21а). В случае 4-го листа изменение параметров фотосинтеза было выражено значительно слабее, чем во 2-м листе (Рис.4.21б), значения амплитуд реакций снижались с увеличением расстояния от зоны повреждения (Рис.4.21д, е). Также можно видеть, что во 2-м листе PRI временно снижался после индукции ВП, а затем восстанавливался до исходных значений (Рис. 4.20в). В 4-м листе реакция PRI была принципиально похожа (Рис.4.21г), но меньше по амплитуде, чем во 2-м листе (Рис.4.21ж). Также можно видеть, что связь между параметрами фотосинтеза и PRI была линейной и достоверной (Рис.4.22).

Важной частью механизма ВП является инактивация H⁺-АТФазы плазмалеммы, в результате чего наблюдаются сдвиги pH в апопласте, цитоплазме и компартментах хлоропластов (Sukhov et al., 2014; Sukhov, 2016). Ранее было показано, что изменения энергозависимой компоненты нефотохимического тушения NPQ_F при распространении электрических сигналов связаны с изменениями pH в люмене хлоропластов (Sukhov et al., 2016); вследствие этого была исследована связь между NPQ_F и величиной фотохимического индекса отражения.

Было показано, что ВП-индуцированные Δ PRI и Δ NPQ_F имели схожую, но противоположную динамику (снижение и возрастание, соответственно). При этом основные изменения этих параметров происходили в течение примерно 20 минут, а затем стабилизировались (Рис.4.23а). Также можно видеть, что связь между ВП-индуцированными изменениями нефотохимического тушения и фотохимического индекса отражения была линейной и очень сильной, $R^2 = 0.81$ и R = -0.9 (Рис.4.23б).

Таким образом, результаты этого блока работ показали, что ВП вызывает изменения фотохимического индекса отражения; механизмы таких изменений, по-видимому, связаны с закислением люмена хлоропластов, которое, как показано, происходит при распространении по растению электрических сигналов (Sukhov et al., 2016).



Рис.4.21. Изменения фотосинтетических параметров и фотохимического индекса, вызванные индукцией ВП на примере гороха. Динамика изменений NPQ, YII и YI во 2-м (а) и 4-м (б) листе гороха; динамика изменений PRI во 2-м (в) 4-м (г) листе гороха; амплитуды изменений нефотохимического тушения (д), квантового выхода фотосистем I и II (е), фотохимического индекса отражения (ж) во 2-м и 4-м листьях гороха (n=5). *, p < 0.05. Стрелкой отмечен момент ожога прилистника верхнего первого листа.



Рис.4.22. Диаграммы рассеяния между индуцированными локальным ожогом Δ PRI и Δ NPQ (a), Δ PRI и Δ YI (б) и Δ PRI и Δ YII (в) (*n*=10).



Рис.4.23. Динамика индуцированных локальными ожогами средних изменений Δ PRI и Δ NPQ_F (*n*=7) (a); диаграмма рассеяния между Δ PRI и Δ NPQ_F (*n*=56) (б). Стрелкой отмечен момент ожога прилистника верхнего первого листа.

ГЛАВА 5. ПРОСТРАНСТВЕННАЯ НЕОДНОРОДНОСТЬ РАСПРЕДЕЛЕ-НИЯ ФОТОХИМИЧЕСКОГО ИНДЕКСА ОТРАЖЕНИЯ И ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЛИСТА КАК ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ ВОЗДЕЙСТВИЯ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ФАКТОРОВ НА РАСТЕНИЯ

Известно, что оптические свойства растений очень разнообразны, благодаря чему, например, выдвигается концепция индивидуальных оптических подписей растений (Ustin, Gamon, 2010; Mahlein, 2016). Неоднородность свойств растений может быть также вызвана неравномерном пространственное и временное действием на них факторов внешней среды и патогенов (Ollinger, 2011; Mahlein, 2016; Kior et al., 2021). Наконец, неравномерная активность процессов может потенциально возникать внутри одного растения. Можно ожидать, что все эти процессы должны сопровождаться формированием пространственной неоднородности в распределении PRI и что такая пространственная неоднородность может стать дополнительным критерием для выявления действия неблагоприятных факторов.

5.1. Исследование неоднородности распределения фотохимического индекса отражения в плоскости листа при индукции водного дефицита

Было проведено исследование неоднородности оптических свойств при развитии засухи на примере фотохимического индекса отражения. Было показано, что на 2-е сутки засухи абсолютное значение PRI возрастало, а затем уменьшалось по сравнению с контролем (Рис.5.1а).

В то же время водный дефицит индуцировал возрастание стандартного отклонения SD(PRI) (Puc.5.1б), что говорит об усилении неоднородности фотохимического индекса отражения в листьях растений. Следует отметить, что SD(PRI) в данном случае был более надёжным показателем, чем абсолютные значения фотохимического индекса отражения, поскольку различия между опытом и контролем для SD(PRI) были более выраженными и однозначными.



Рис.5.1. Изменения абсолютного значения PRI и стандартного отклонения для его пространственного распределения в плоскости листа (SD(PRI)) при развитии почвенной засухи на примере гороха (n=50). *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001.

Таким образом, на примере развития засухи у гороха показано, что пространственная неоднородность распределения PRI в листе растения может усиливаться при действии неблагоприятных факторов и выступать в качестве показателя для обнаружения такого действия.

5.2. Исследование неоднородности распределения активности световой стадии фотосинтеза у гороха при индукции водного дефицита

Неоднородность активности фотосинтеза отмечается некоторыми авторами, потенциальной ее причиной может быть разное по интенсивности в пространстве действие неблагоприятных факторов (Rascher, Nedbal, 2006; Hubbart et al., 2012; Retkute et al., 2015). В то же время, фотосинтетические пигменты и активность фотосинтеза оказывают большое влияние на поглощение и отражение света в видимом диапазоне (Peñuelas, Filella, 1998; Kume et al., 2018), в частности, показана сильная связь между ними и фотохимическим индексом отражения (Garbulsky et al., 2010, 2011; Zhang et al., 2016). Поэтому пространственная неоднородность активности фотосинтеза может быть одной из причин неравномерного распределения оптических свойств растений при стрессе.

Линейный поток электронов (LEF) через электрон-транспортную цепь фотосинтетического аппарата является одним из важных показателей активности фотосинтеза (Kalaji et al., 2014). Было проведено исследование пространственной неоднородности распределения LEF в плоскости листа при развитии засухи. Было показано, что коэффициент вариации линейного потока электронов CV(LEF) достоверно возрастал по сравнению с контролем, начиная со второго дня водного дефицита (Рис.5.2). Потенциально, неоднородность активности фотосистемы II и линейного потока электронов через электрон-транспортную цепь хлоропластов может быть причиной развития пространственной неоднородности распределения PRI, показанного в предыдущем разделе.



Рис.5.2. Изменения коэффициента вариации для пространственного распределения линейного потока электронов CV(LEF) в плоскости листа при развитии водного дефицита у гороха (n=6). *, p < 0.05; **, p < 0.01.

5.3. Исследование путей формирования неоднородности фотосинтетического ответа у листа с использованием математической модели

Одним из факторов, влияющим на пространственную неоднородность активности фотосинтеза, может быть доступность углекислого газа и, следовательно, открытость устьиц. Был проведен теоретический анализ пространственной неоднородности фотосинтетической активности листа с помощью разработанной математической модели (см. подробное описание приведено в разделе 2.7). Математическая модель описывала двумерную систему фотосинтезирующих и электрически активных клеток, связанных через апопласт (Рис.2.3). Фотосинтез описывали на основе модели Farquhar – von Caemmerer – Berry (Farquhar et al., 1980; von Caemmerer et al., 2009). Обмен углекислым газом с окружающей средой осуществлялся через устьица листа, описано его перемещение по апопласту и через мембраны в цитоплазму и хлоропласты. Учитывался также pHзависимый переход углекислого газа из незаряженной формы в заряженную и обратно. Описание ионного транспорта через плазмалемму включало описание работы калиевых ионных каналов, H⁺-АТФазы и K⁺/H⁺-антипорта. Доступность углекислого газа для растения является важным лимитирующим фактором для фотосинтеза (Farquhar et al., 1980; von Caemmerer et al., 2009). Недостаточная активность цикла Кальвина при лимитировании CO₂ нарушает сток продуктов световой стадии фотосинтеза и приводит к ее угнетению и развитию нефотохимического тушения (Rascher, Nedbal, 2006; Pavlovič et al., 2011). По этой причине мы исследовали влияние проводимости и плотности устьиц на неоднородность ассимиляции углекислого газа листом. На рисунке 5.3а представлены световые кривые ассимиляции (A_{hv}) в условиях различной средней проводимости листа для CO₂, симулированные моделью; плотность устьиц составляла 1 устьице на 9 клеток. Среднюю проводимость листа рассчитывали как проводимость отдельного устьица умноженную на плотность устьиц в листе.

Можно видеть, что при более низкой средней проводимости листа для CO₂ уровень ассимиляции был ниже и световая кривая достигала насыщения при более низком освещении, чем более высокой проводимости. Экспериментальные данные были качественно похожи на кривые, описанные моделью (Рис.5.36).



Рис.5.3. Рассчитанные на основе модели (а) и экспериментальные (б) световые зависимости ассимиляции CO₂ (A_{hv}) при различной средней проводимости листа для CO₂ (g_s). Плотность устьиц в модели была 1 устьице на 9 клеток (вариант 3х3 клетки). В экспериментах использовали растения гороха, n=5 в случае g_s < 0.04 моль м⁻² с⁻¹ и n=9 при g_s > 0.04 моль м⁻² с⁻¹.

Тем не менее, в эксперименте при схожей средней проводимости листа для CO₂ ассимиляция была несколько ниже, чем в модели (Рис.5.3), что потенциально может быть связано с различающейся в модели и эксперименте плотности устьиц или другими параметрами. Также качественная схожесть результатов, полученных в эксперименте и симулированных моделью, подтверждается тем, что в обоих случаях связь между ассимиляцией и средней проводимостью листа может быть описана логарифмическими зависимостями, которые очень близкими по своей форме (Рис.5.4). Это подтверждает корректность разработанной нами модели.



Рис.5.4. Симулированные моделью (а) и экспериментальные (б) диаграммы рассеяния между ассимиляцией CO₂ (A_{hv}) и средней проводимостью листа для CO₂ (g_S) в условиях освещения растений фотоситетически активным светом интенсивностью 758 µмоль м⁻² c⁻¹. Модель симулировала усредненное A_{hv} листа при проводимости средней проводимости листа для CO₂, равной 0.007, 0.012, 0.023, 0.064 и 0.096 моль м⁻² c⁻¹. Плотность устьиц составляла 1 устьице на 9 клеток. В экспериментах использовали растения гороха (*n*=14). R² – коэффициент детерминации.

Далее было проведено исследование пространственной неоднородности ассимиляции CO₂ по поверхности листа с помощью разработанной математической модели. Для оценки неоднородности пространственного распределения исследуемых параметров использовалось стандартное отклонение и коэффициент вариабельности. При этом коэффициент вариабельности можно считать более надёжным показателем, поскольку он является нормированным и слабо зависит от абсолютной величины параметра.

Было показано, что зависимости стандартного отклонения ассимиляции SD(A_{hv}) и коэффициента вариации ассимиляции CV(A_{hv}) от интенсивности света имеет вид кривой насыщения (Рис.5.5).



Рис.5.5. Световые кривые параметров пространственной гетерогенности, рассчитанных на основе симулированного моделью пространственного распределения ассимиляции по листу. (а) световая кривая стандартного отклонения ассимиляции (SD(A_{hv})). А_{hv} симулировали при средней проводимости листа для CO₂ (g_S), равной 0.023 и 0.064 моль м⁻² с⁻¹. «3x3» – плотность устьиц была 1 устьице на 9 клеток; «5x5» – плотность устьиц была 1 устьице на 9 клеток; «5x5» – плотность устьиц была 1 устьице на 25 клеток. (б) световая кривая коэффициента вариации ассимиляции (CV(A_{hv})). (в) Зависимость от света соотношения SD(A_{hv}) при g_S = 0.023 моль м⁻² с⁻¹ к SD(A_{hv}) при g_S = 0.064 моль м⁻² с⁻¹, плотность устьиц в обоих случаях была 1 устьице на 9 клеток, а также аналогичная зависимость для CV(A_{hv}).
Также было выявлено, что при уменьшении средней проводимости листа для CO₂ с 0.064 до 0.023 моль м⁻² с⁻¹ без изменения плотности устьиц, SD(A_{hv}) не изменяется при низкой интенсивности света, а при дальнейшем увеличении интенсивности света уровень SD(A_{hv}) становится ниже, чем при g=0.064 моль м⁻² с⁻¹ (Рис.5.5а).

При этом соотношение SD(A_{hv}) при средней проводимости листа 0.023 моль м⁻² с⁻¹ к SD(A_{hv}) при средней проводимости листа 0.064 моль м⁻² с⁻¹ было выше единицы только при небольшой интенсивности света, а при дальнейшем увеличении интенсивности света уменьшалось почти в 2 раза (Рис.5.5в).

Однако при исследовании CV(A_{hv}) для средних проводимостей листа, равных 0.064 и 0.023 моль м⁻² с⁻¹ (плотность устьиц в обоих случаях – 1 устьице на 9 клеток), различия не были выраженными (Рис.5.5б). При этом соотношение SD(A_{hv}) при средней проводимости листа 0.023 моль м⁻² с⁻¹ к SD(A_{hv}) при средней проводимости 0.064 моль м⁻² с⁻¹ было выше единицы при интенсивности света до 400 µмоль м⁻² с⁻¹, а при увеличении интенсивности света это соотношение было близко к единице (Рис.5.5в). Такое снижение проводимости устьиц аналогично частичному закрытию устьиц (которые при этом сохраняют часть своей проводимости), что может наблюдаться при развитии водного стресса у растений.

С другой стороны, снижение плотности устьиц аналогично полному закрытию части устьиц у листа. Было показано, что снижение плотности устьиц (1 устьице на 25 клеток вместо 1 устьице на 9 клеток), соответствующее снижению средней проводимости листа от 0.064 – до 0.023 моль м⁻² с⁻¹, приводит к резкому возрастанию SD(A_{hv}) и CV(A_{hv}) (Puc.5.5a, б).

Таким образом, модель показывает возрастание пространственной вариабельности фотосинтетической активности при возрастании интенсивности освещения и снижении проводимости отдельных устьиц или уменьшении количества открытых устьиц.

Для проверки результатов моделирования, далее было выполнено экспериментальное исследование зависимости неоднородности фотосинтетического ответа от интенсивности света. Измерение пространственного распределения ассимиляции по листу технически невозможно, поэтому далее была проведена оценка связи между ассимиляцией и величиной нециклического потока электронов через фотосистему II (LEF), для которой возможен пространственный имиджинг. Можно видеть, что между A_{hv} и LEF существует связь, которая линейна при интенсивности света ниже 500 µмоль м⁻² с⁻¹, а

при дальнейшем увеличении PAR наблюдается тенденция к насыщению зависимости (Рис.5.6а). Показанная линейная зависимость была использована для расчета фотосинтетической ассимиляции (A_{hv}) и оценки ее пространственного распределения.



Рис.5.6. Зависимость ассимиляции CO₂ в процессе фотосинтеза (A_{hv}) от линейного потока электронов через ЭТЦ хлоропластов и линейное калибровочное уравнение (a); зависимости LEF и A_{hv} (рассчитанной на основании LEF) от интенсивности PAR (n=6) (б); зависимости параметров пространственной неоднородности A_{hv} (SD(A_{hv}) и CV(A_{hv})) от интенсивности PAR (n=6) (в). R – коэффициент детерминации.

На рисунке 5.66 представлены световые кривые LEF, которая была определена экспериментально (с использованием IMAGING-PAM M-Series MINI Version), и A_{hv}, рассчитанная на основании LEF. Максимальная интенсивности свет была ограничена 500 µмоль м⁻² с⁻¹, так как при больших интенсивностях света использование линейной

калибровки некорректно. Рисунок показывает, что рассчитанные величины ассимиляции приблизительно соответствуют величинам ассимиляции у гороха, при соответствующих интенсивностях освещения (Sukhov et al., 2015).

Далее было показано, что световые кривые $SD(A_{hv})$ и $CV(A_{hv})$ (Рис.5.6в), рассчитанной на основе параметров пространственного распределения экспериментально полученного LEF, были качественно и количественно похожи на кривые, симулированные моделью (Рис.5.5а, б). Дополнительно было показано, что в условиях водного дефицита снижается средняя проводимость листа для CO_2 (Рис.5.7а) и усиливается пространственная неоднородность ассимиляции $CV(A_{hv})$ (Рис.5.7б). Это подтверждает гипотезу о роли закрытия и проводимости устьиц для развития пространственной неоднородности фотосинтетической активности.



Рис.5.7. Влияние водного дефицита (1 день) на среднюю проводимость листа для CO_2 (g_s) (a) и коэффициент вариации для ассимиляции ($CV(A_{hv})$) (б) (n=6). *, p < 0.05.

Таким образом, наша модель показывает, что снижение проводимости устьиц, которое может наблюдаться при действии неблагоприятных факторов на растения (например, при развитии водного дефицита), способствует усилению пространственной неоднородности фотосинтетических показателей листа. Также активность фотосинтеза и его неоднородность должна оказывать значительное влияние на отражение растений в видимом диапазоне благодаря сильному поглощению света в синем и красном диапазоне спектра (Kume et al., 2018), а также связи с ксантофилловым циклом (Gamon et al., 1992) и сжатием хлоропластов (Evain et al., 2004), влияющими на коэффициенты отражения растений в жёлто-зелёном диапазоне. В наших экспериментах было показано, что неоднородность пространственного распределения фотосинтетических показателей (Рис.5.2, 5.7) и фотохимического индекса отражения (Рис.5.1) в листьях может усиливаться при увеличении интенсивности освещения и при развитии водного дефицита. Потенциально, такое усиление неоднородности может выступать в качестве критерия действия неблагоприятных факторов при мониторинге состояния растений (в частности, оно может использоваться в качестве дополнительного показателя развития засуха). Однако проверка такой возможности требует дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках диссертационной работы было проведено исследование применимости нормализованных индексов отражения для оценки состояния высших растений при локальном и системном действии неблагоприятных абиотических факторов. В ходе исследования был получен ряд важных результатов.

Прежде всего, комплексное исследование влияния неблагоприятных факторов на индексы отражения позволило предложить два новых нормализованных отражения RI(613, 605) и RI(670, 432), которые были чувствительны к состоянию растений в условиях системного действия неблагоприятных факторов, включая кратковременный водный дефицит, длительную почвенную засуху и нагрев; кроме того, предложенные индексы характеризовались сильной линейной связью с максимальным квантовым выходом фотохимических реакций фотосистемы II и относительным содержанием воды в листьях растений. Предложенные индексы отражения могут стать новым инструментом для дистанционного мониторинга действия неблагоприятных факторов на растения и оценки фотосинтетических характеристик растительных объектов.

Аналогичное исследование, проведенное в условиях локального действия неблагоприятных факторов (локальный ожог) и распространения по растению стрессовых сигналов электрической природы, показало наличие большого массива нормализованных индексов отражения, которые чувствительны к распространению таких сигналов. Такой результат создает предпосылки для разработки методов дистанционного мониторинга распространения электрических сигналов у растений; учитывая, что в настоящее время непосредственное измерение таких сигналов контактными электродами активно используется для оценки состояния растений (Chatterjee et al., 2015, 2018; Chen et al., 2016; Saraiva et al., 2017; Simmi et al., 2020), такие дистанционные методы могут также иметь высокую прикладную значимость.

Отдельно было проведено исследование подходов к повышению эффективности использования фотохимического индекса отражения, который тесно связан с фотосинтетическими процессами и чувствителен к наиболее ранним изменениям состояния растений при действии неблагоприятных абиотических факторов. Прежде всего, был предложен новый метод регистрации фотохимического индекса отражения с использованием импульсов жёлто-зелёного измерительного света, на основании которого была разрабо-

тана система PRI-имиджинга (совместно с ИПФ РАН). Было показано, что использование светоиндуцированных изменений PRI повышало его эффективность для выявления изменений состояния растения и оценки фотосинтетических процессов при системном действии неблагоприятных факторов (водный дефицит и нагрев); с другой стороны, использование изменений PRI, вызванных локальным ожогом и распространением электрических сигналов по растению, также было более эффективно для выявления фотосинтетических ответов растения. Наконец, было показано, что использование модифицированных PRI, имеющих большую измерительную длину волны (например, 545 или 555 нм) обеспечивало более высокую чувствительность индекса к изменениям фотосинтетических процессов (особенно, в условиях чередования периодов освещения и темноты). Полученные результаты могут стать основой для развития новых подходов к повышению эффективности применения PRI в дистанционном мониторинге состояния растений.

В ходе работы была также получена дополнительная информация о путях формирования изменения PRI у растений. В частности, была показана связь изменений PRI с изменениями энергозависимого компонента NPQ при системном действии неблагоприятных факторов или при локальном действии неблагоприятных факторов и распространении электрических сигналов. Такой результат хорошо согласовывался с подтверждением связи изменений PRI с изменениями pH люмена хлоропластов, которое также было получено в рамках диссертационной работы. Дополнительно было показано, что типичный PRI зависит как от быстрых (вероятно, pH-зависимое сжатие хлоропластов), так и от более медленных (pH-зависимые переходы в цикле ксантофиллов) процессов; при этом, уменьшение измерительной длины волны приводит к увеличению вклада медленных процессов в изменения PRI, а увеличение измерительное длины волны приводит к увеличению вклада быстрых процессов в такие изменения.

На завершающем этапе работы было выявлено усиление пространственной неоднородности распределения фотохимического индекса отражения в плоскости листа при действии неблагоприятных абиотических факторов (свет с высокой интенсивностью, водный дефицит). Такое усиление сопровождалось возрастанием пространственной неоднородности фотосинтетических показателей, которое, по-видимому, и обуславливало формирование неоднородности PRI в пределах листа. Для анализа возможных механизмов такой неоднородности, была разработана двумерная модель распределения фото-

синтетических процессов по листу. Исследование разработанной модели показало, что уменьшение проводимости устьиц или снижение числа открытых устьиц (что является типичным ответом на развитие водного дефицита) усиливает пространственную неоднородность распределения фотосинтетических показателей в плоскости листа; повидимому, именно этот механизм может участвовать в формировании неоднородности фотосинтетических показателей и PRI в условиях засухи. С прикладной точки зрения, выявленное усиление неоднородности пространственного распределения фотохимического отражения может использоваться в качестве дополнительного критерия действия неблагоприятных факторов на растения.

В целом, полученные результаты могут быть основой для развития методов дистанционного мониторинга состояния растения в условиях открытого и защищенного грунта, что является актуальным для сельского хозяйства (культивирование растений) и экологического мониторинга.

выводы

1. На основании комплексного исследования изменений нормализованных индексов отражения (диапазон видимого света) при кратковременном водном дефиците, почвенной засухе и действии повышенной температуры, предложены два новых индекса отражения (RI(613, 605) и RI(670, 432)), которые могут быть использованы как дополнительный инструмент для выявления системного действия неблагоприятных абиотических факторов на растения. Также показано, что локальные ожоги и индуцированные ими электрические сигналы вызывают быстрые изменения ряда индексов отражения, рассчитываемых на основании спектральных диапазонов 540–625 нм и 520–560 нм, а также диапазонов 510–560 нм и 450–520 нм.

2. Показано, что фотохимический индекс отражения меняется при системном и локальном действии абиотических факторов (водный дефицит, повышенные температуры, локальный ожог); при этом выраженность изменений и сила их связи с показателями фотосинтеза может существенно варьировать в различных экспериментальных условиях. Для повышения эффективности использования PRI был предложен ряд подходов, включая разработку нового метода измерения индекса с использованием вспышек желто-зеленого измерительного света, использование светоиндуцированных изменений PRI и использование модифицированных фотохимических индексов отражения, имеющих измененную измерительную длину волны.

3. Показано, что быстрые изменения фотохимического индекса отражения включают в себя быстро-релаксирующую и медленно-релаксирующую компоненты, имеющие различные спектральные максимумы и разную силу связи с показателями фотосинтетических процессов; при этом, подтверждено, что изменения PRI связаны с закислением люмена хлоропластов.

4. Показано, что действие неблагоприятных факторов (в частности, водного дефицита) вызывает возрастание неоднородности пространственного распределения величины PRI в плоскости листа, которая может быть использована в качестве показателя действия неблагоприятных факторов на растения. Экспериментальное и теоретическое исследование показало, что такая неоднородность связана с усилением неоднородности нециклического потока электронов вследствие закрытия устьиц листа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Булычев А.А., Черкашин А.А., Вреденберг В., Рубин А.Б., Зыков В.С., Мюллер С.Х. Флуоресценция и фотосинтетическая активность хлоропластов в кислых и щелочных зонах клеток *Chara corallina* // Физиология растений. 2001. Т. 48. С. 384–391.

2. Бухов Н.Г. Динамическая световая регуляция фотосинтеза // Физиология растений. 2004. Т. 51. С. 825–837.

3. Сухов В.С., Воденеев В.А. Математическая модель потенциала действия у высших растений // МКО 2005. Т. 3. С. 967 – 969.

4. Сухова Е.М., Сухов В.С. Зависимость поступления СО₂ в растительную клетку от активности H⁺-ATP-азы плазматической мембраны. Теоретический анализ // Биологические мембраны. 2018. Т. 35. С. 52–65.

5. Agapiou A., Hadjimitsis D.G., Papoutsa C., Alexakis D.D., Papadavid G. The importance of accounting for atmospheric effects in the application of NDVI and interpretation of satellite imagery supporting archaeological research: The case studies of Palaepaphos and Nea Paphos Sites in Cyprus // Remote Sens. 2011. V. 3. P. 2605–2629.

6. Akhtar N., Ishak M.I.S., Bhawani S.A., Umar K. Various natural and anthropogenic factors responsible for water quality degradation: A review // Water. 2021. V. 13. Article 2660.

7. Ballesteros R., Ortega J.F., Hernandez D., Moreno M.A. Onion biomass monitoring using UAV-based RGB imaging // Precision Agric. 2018. V. 19. P. 840–857.

8. Balzarolo M., Peñuelas J., Filella I., Portillo-Estrada M., Ceulemans R. Assessing ecosystem isoprene emissions by hyperspectral remote sensing // Remote Sens. 2018. V. 10. Article 1086.

9. Baret F., Jacquemoud S., Hanocq J.F. The soil line concept in remote sensing // Remote Sens. Rev. 1993. V. 7. P. 65–82.

10. Batra N.G., Sharma V., Kumari N. Drought-induced changes in chlorophyll fluorescence, photosynthetic pigments, and thylakoid membrane proteins of *Vigna radiata* // J. Plant Interact. 2014. V. 9. P. 712–721.

 Bayat B., Van Der Tol C., Verhoef W. Remote sensing of grass response to drought stress using spectroscopic techniques and canopy reflectance model inversion // Remote Sens.
 2016. V. 8. Article 557.

 Benz J.P., Lintala M., Soll J., Mulo P., Bölter B. A new concept for ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase binding to plant thylakoids // Trends Plant Sci. 2010. V. 15. P. 608– 613.

13. Berni J., Zarco-Tejada P., Suárez L., González-Dugo V., Fereres E. Remote sensing of vegetation from UAV platforms using lightweight multispectral and thermal imaging sensors // Int. Arch. Photogramm. Remote Sens. Spat. Inf. Sci. 2014. V. 38. Article 6.

 Bulychev A.A., Komarova A.V. Photoregulation of photosystem II activity mediated by cytoplasmic streaming in Chara and its relation to pH bands // Biochim. Biophys. Acta. 2017.
 V. 1858. P. 386–395.

15. Cabrera J.C.B., Hirl R.T., Schäufele R., Macdonald A., Schnyder H. Stomatal conductance limited the CO₂ response of grassland in the last century // BMC Biol. 2021. V. 19. A. 50.

16. Cardona T., Shao S., Nixon P.J. Enhancing photosynthesis in plants: the light reactions// Essays Biochem. 2018. V. 62. P. 85–94.

17. Carter G.A. Ratios of leaf reflectances in narrow wavebands as indicators of plant stress// Int. J. Remote Sens. 1994. V. 15. P. 697–703.

18. Castro K.L., Sanchez-Azofeifa G.A. Changes in spectral properties, chlorophyll content and internal mesophyll structure of senescing *Populus balsamifera* and *Populus tremuloides* leaves // Sensors. 2008. V. 8. P. 51–69.

19. Chatterjee S.K., Das S., Maharatna K., Masi E., Santopolo L., Mancuso S., Vitaletti A. Exploring strategies for classification of external stimuli using statistical features of the plant electrical response // J. R. Soc. Interface. 2015. V. 12. Article 20141225.

20. Chatterjee S.K., Malik O., Gupta S. Chemical sensing employing plant electrical signal response-classification of stimuli using curve fitting coefficients as features // Biosensors. 2018. V. 8. Article 83.

21. Chen Y., Zhao D.-J., Wang Z.-Y., Wang Z.-Y., Tang G., Huang L. Plant electrical signal classification based on waveform similarity // Algorithms. 2016. V. 9. Article 70.

22. Cheng Y.B., Middleton E.M., Zhang Q., Huemmrich K.F., Campbell P.K.E., Corp L.A., Cook B.D., Kustas W.P., Daughtry C.S. Integrating solar induced fluorescence and the photochemical reflectance index for estimating gross primary production in a cornfield // Remote Sens. 2013. V. 5. P. 6857–6879. 23. Córcoles J.I., Ortega J.F., Hernández D., Moreno M.A. Estimation of leaf area index in onion (*Allium cepa L.*) using an unmanned aerial vehicle // Biosyst. Eng. 2013. V. 115. P. 31–42.

24. Datt, B. A new reflectance index for remote sensing of chlorophyll content in higher plants: tests using eucalyptus leaves // J. Plant Physiol. 1999. V. 154. P. 30–36.

25. Day T.A., Vogelmann T.C. Alterations in photosynthesis and pigment distributions in pea leaves following UV-B exposure // Physiol. Plant. 1995.V. 94. P. 433-440.

26. Deamer D.W., Crofts A.R., Packer L. Mechanisms of light-induced structural changes in chloroplasts I. Light-scattering increments and ultrastructural changes mediated by proton transport // Biochim. Biophys. Acta. 1967. V. 131. P. 81–96.

27. Demmig-Adams B. Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin // Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenerg. 1990. V. 1020. P. 1–24.

28. El-Hendawy S.E., Alotaibi M., Al-Suhaibani N., Al-Gaadi K., Hassan W., Dewir Y.H., Emam M.A.E.-G., Elsayed S., Schmidhalter U. comparative performance of spectral reflectance indices and multivariate modeling for assessing agronomic parameters in advanced spring wheat lines under two contrasting irrigation regimes // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. Article 1537.

29. Ellison D., Morris C. E., Locatelli B., Sheil D., Cohen J., Murdiyarso D. et al. Trees, forests and water: Cool insights for a hot world // Glob. Environ. Change. 2017. V. 43. P. 51–61.

30. Eppel A., Rachmilevitch S. Photosynthesis and photoprotection under drought in the annual desert plant *Anastatica hierochuntica* // Photosynthetica. 2015. V. 54. P. 143–147.

31. Esteban R., Barrutia O., Artetxe U., Fernández-Marín B., Hernández A., García-Plazaola J.I. Internal and external factors affecting photosynthetic pigment composition in plants: A meta-analytical approach // New Phytol. 2015. V. 206. P. 268–280.

32. Evain S., Flexas J., Moya I. A new instrument for passive remote sensing: 2. Measurement of leaf and canopy reflectance changes at 531 nm and their relationship with photosynthesis and chlorophyll fluorescence // Remote Sens. Environ. 2004. V. 91. P. 175–185.

33. Evans J.R., Kaldenhoff R., Genty B., Terashima I. Resistances along the CO₂ diffusion pathway inside leaves // J. Exp. Bot. 2009. V. 60. P. 2235–2248.

34. Fahad S., Bajwa A.A., Nazir U., Anjum S.A., Farooq A., Zohaib A., Sadia S., Nasim W., Adkins S., Saud S., Ihsan M.Z., Alharby H., Wu C., Wang D., Huang J. Crop production

under drought and heat stress: Plant responses and management options // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. Article 1147.

35. Farmer E.E., Gao Y.Q., Lenzoni G., Wolfender J.L., Wu Q. Wound- and mechanostimulated electrical signals control hormone responses // New Phytol. 2020. V. 227. P. 1037– 1050.

36. Farquhar G.D., von Caemmerer S., Berry J.A. A biochemical model of photosynthetic-CO₂ assimilation in leaves of C₃ species // Planta 1980. V. 149. P. 78-90.

37. Filella I., Amaro T., Araus J.L., Peñuelas J. Relationship between photosynthetic radiation-use efficiency of barley canopies and the photochemical reflectance index (PRI) // Physiol. Plant. 1996. V. 96. P. 211–216.

38. Filella I., Porcar-Castell A., Munné-Bosch S., Bäck J., Garbulsky M.F., Peñuelas J. PRI assessment of long-term changes in carotenoids/chlorophyll ratio and short-term changes in de-epoxidation state of the xanthophyll cycle // Int. J. Remote Sens. 2009. V. 30. P. 4443–4455.

39. Flexas J., Barbour M.M., Brendel O., Cabrera H.M., Carriquí M., Díaz-Espejo A., Douthe C., Dreyer E., Ferrio J.P., Gago J., Gallé A., Galmés J., Kodama N., Medrano H., Niinemets Ü., Peguero-Pina J.J., Pou A., Ribas-Carbó M., Tomás M., Tosens T., Warren C.R. Mesophyll diffusion conductance to CO₂: an unappreciated central player in photosynthesis // Plant Sci. 2012. V. 193-194. P. 70-84.

40. Fowler J.E. Compressive pushbroom and whiskbroom sensing for hyperspectral remotesensing imaging // Proceedings of the International Conference on Image Processing (ICIP). Paris, France. 27–30 October 2014. P. 684–688.

41. Franklin K.A., Quail P.H. Phytochrome functions in *Arabidopsis* development // J. Exp.
Bot. 2010. V. 61. P. 11–24.

42. Gallé A., Lautner S., Flexas J., Fromm J. Environmental stimuli and physiological responses: The current view on electrical signaling // Environ. Exp. Bot. 2015. V. 114. P. 15–21.

43. Gallé A., Lautner S., Flexas J., Ribas-Carbo M., Hanson D., Roesgen J., Fromm J. Photosynthetic responses of soybean (*Glycine max L.*) to heat-induced electrical signalling are predominantly governed by modifications of mesophyll conductance for CO_2 // Plant Cell Environ. 2013. V. 36. P. 542–552.

44. Gamon J., Peñuelas J., Field C. A narrow-waveband spectral index that tracks diurnal changes in photosynthetic efficiency // Remote. Sens. Environ. 1992. V. 41. P. 35–44.

45. Gamon J.A., Serrano L., Surfus J.S. The photochemical reflectance index: An optical indicator of photosynthetic radiation use efficiency across species, functional types, and nutrient levels // Oecologia. 1997. V. 112. P. 492–501.

46. Gamon J.A., Surfus J.S. Assessing leaf pigment content and activity with a reflectometer // New Phytol. 1999. V. 143. P. 105–117.

47. Gao J., Wang F., Sun J., Tian Z., Hu H., Jiang S., Luo Q., Xu Y., Jiang D., Cao W., et al. Enhanced Rubisco activation associated with maintenance of electron transport alleviates inhibition of photosynthesis under low nitrogen conditions in winter wheat seedlings // J. Exp. Bot. 2018. V. 69. P. 5477–5488.

48. Gao Q., Zhao P., Zeng X., Cai X., Shen W. A model of stomatal conductance to quantify the relationship between leaf transpiration, microclimate and soil water stress // Plant Cell Environ. 2002. V. 25. P. 1373–1381.

49. Garbulsky M.F., Peñuelas J., Gamon J., Inoue Y., Filella I. The photochemical reflectance index (PRI) and the remote sensing of leaf, canopy and ecosystem radiation use efficiencies. A review and meta-analysis // Remote Sens. Environ. 2011. V. 115. P. 281–297.

50. Garbulsky M.F., Peñuelas J., Papale D., Ardö J., Goulden M.L., Kiely G., Richardson A.D., Rotenberg E., Veenendaal E.M., Filella I. Patterns and controls of the variability of radiation use efficiency and primary productivity across terrestrial ecosystems // Glob. Ecol. Biogeogr. 2010. V. 19. P. 253–267.

51. Gitelson A., Merzlyak M.N. Signature analysis of leaf reflectance spectra: Algorithm development for remote sensing of chlorophyll // J. Plant Physiol. 1996. V. 148. P. 494–500.

52. Glenn E.P., Huete A.R., Nagler P.L., Nelson S.G. Relationship between remotelysensed vegetation indices, canopy attributes and plant physiological processes: What vegetation indices can and cannot tell us about the landscape // Sensors. 2008. V. 8. P. 2136–2160.

53. Gornall J., Betts R., Burke E., Clark R., Camp J., Willett K., Wiltshire A. Implications of climate change for agricultural productivity in the early twenty-first century // Phil. Trans.
R. Soc. B. 2010. V. 365. P. 2973–2989.

54. Gould K.S. Nature's Swiss army knife: The diverse protective roles of anthocyanins in leaves // J. Biomed. Biotech. 2004. V. 2004. P. 314–320.

Gradmann D. Impact of apoplast volume on ionic relations in plant cells // J. Membr.
 Biol. 2001. V. 184. P. 61–69.

56. Guo W., Carroll M.E., Singh A., Swetnam T.L., Merchant N., Sarkar S., Singh A.K., Ganapathysubramanian B. UAS-based plant phenotyping for research and breeding applications // Plant Phenomics. 2021. V. 2021. Article 9840192.

57. Guo Y.Y., Yu H.Y., Kong D.S., Yan F., Zhang Y.-J. Effects of drought stress on growth and chlorophyll fluorescence of *Lycium ruthenicum Murr*. Seedlings // Photosynthetica. 2016.
V. 54. P. 524–531.

58. Hansen U.-P., Gradmann D., Sanders D., Slayman C.L. Interpretation of current-voltage relationships for "active" ion transport systems: I. Steady-state reaction-kinetic analysis of class-I mechanisms // J. Membr. Biol. 1981. V. 63. P. 165–190.

59. Harris A., Owen S.M., Sleep D., Pereira M.D. Constitutive changes in pigment concentrations: implications for estimating isoprene emissions using the photochemical reflectance index // Physiol. Plant. 2016. V. 156. P. 190–200.

60. Heber U. Conformational changes of chloroplasts induced by illumination of leaves *in vivo* // Biochim. Biophys. Acta. 1969.V. 180. P. 302–319.

61. Hernández-Clemente R., Navarro-Cerrillo R.M., Zarco-Tejada P.J. Carotenoid content estimation in a heterogeneous conifer forest using narrow-band indices and PROSPECT + DART simulations // Remote Sens. Environ. 2012. V. 127. P. 298–315.

62. Hinojo-Hinojo C., Goulden M.L. Plant traits help explain the tight relationship between vegetation indices and gross primary production // Remote Sens. 2020. V. 12. Article 1405.

63. Hisabori T., Konno H., Ichimura H., Strotmann H., Bald D. Molecular devices of chloroplast F1-ATP synthase for the regulation // Biochim. Biophys. Acta. 2002. V. 1555. P. 140–146.

64. Hmimina G., Dufrêne E., Soudani K. Relationship between photochemical reflectance index and leaf ecophysiological and biochemical parameters under two different water statuses: towards a rapid and efficient correction method using real-time measurements // Plant Cell Environ. 2014. V. 37. P. 473-487.

65. Hoagland D.R., Arnon D.I. The water-culture method for growing plants without soil // Calif. Agr. Exp. Sta. Cir. 347, Univ. of California, Berkeley, 1950.

66. Hochmal A.K., Schulze S., Trompelt K., Hippler M. Calcium-dependent regulation of photosynthesis // Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 2015. V. 1847. P. 993–1003.

67. Huang J., Wei C., Zhang Y., Blackburn G.A., Wang X., Wei C., Wang J. Meta-analysis of the detection of plant pigment concentrations using hyperspectral remotely sensed data // PLoS ONE 2015. V. 10. Article e0137029.

68. Huang S., Tang L., Hupy J.P., Wang Y., Shao G. A commentary review on the use of normalized difference vegetation index (NDVI) in the era of popular remote sensing // J. For. Res. 2021. V. 32. P. 1–6.

69. Hubbart S., Ajigboye O.O., Horton P., Murchie E.H. The photoprotective protein PsbS exerts control over CO₂ assimilation rate in fluctuating light in rice // Plant J. 2012. V. 71. P. 402–412.

Huete A.R. A soil-adjusted vegetation index (SAVI) // Remote Sens. Environ. 1988. V.
 P. 295–309.

 Hung C., Zhe X., Sukkarieh S. Feature learning based approach for weed classification using high resolution aerial images from a digital camera mounted on a UAV // Remote Sens.
 2014. V. 6. P. 12037–12054.

72. Jahns P., Latowski D., Strzalka K. Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: the role of antenna proteins and membrane lipids // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1787. P. 3–14.

73. Jang G., Kim J., Yu J.-K., Kim H.-J., Kim Y., Kim D.-W., Kim K.-H., Lee C.W., Chung Y.S. Review: Cost-effective unmanned aerial vehicle (UAV) platform for field plant breeding application // Remote Sens. 2020. V. 12. Article 998.

74. Jiang J., Chen S., Cao S., Wu H., Zhang L., Zhang H. Leaf area index retrieval based on canopy reflectance and vegetation index in eastern China // J. Geogr. Sci. 2005. V. 15. P. 247–254.

Joliot P.A., Finazzi G. Proton equilibration in the chloroplast modulates multiphasic kinetics of nonphotochemical quenching of fluorescence in plants // Proc. Nat. Acad. Sci. 2010.
V. 107. P. 12728–12733.

76. Jones H.G. Use of infrared thermometry for estimation of stomatal conductance as a possible aid to irrigation scheduling // Agric. For. Meteorol. 1999. V. 95. P. 139–149.

77. Jones H.G., Leinonen I. Thermal Imaging for the study of plant water relations // J. Agric. Meteorol. 2003. V. 59. P. 205–217.

78. Kalaji H.M., Schansker G., Ladle R.J., Goltsev V., Bosa K., Allakhverdiev S.I., Brestic M., Bussotti F., Calatayud A., Dąbrowski P. et al. Frequently asked questions about *in vivo* chlorophyll fluorescence: practical issues // Photosynth. Res. 2014. V. 122. P. 121–158.

79. Kattenborn T., Fassnacht F.E., Schmidtlein S. Differentiating plant functional types using reflectance: Which traits make the difference? // Remote Sens. Ecol. Conserv. 2019. V. 5. P. 5–19.

 Kaufman Y.J., Tanré D. Atmospherically resistant vegetation index (ARVI) for EOS-MODIS // IEEE Transact. Geosci. Remote Sens. 1992. V. 30. P. 261–270.

81. Kinoshita T., Shimazaki K. Blue light activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells // EMBO J. 1999. V. 18. P. 5548–5558.

82. Kior A., Sukhov V., Sukhova E. Application of reflectance indices for remote sensing of plants and revealing actions of stressors // Photonics. 2021. V. 8. Article 582.

83. Klem K., Mishra K.B., Novotná K., Rapantová B., Hodaňová P., Mishra A., Kováč D., Urban O. Distinct growth and physiological responses of *Arabidopsis thaliana* natural accessions to drought stress and their detection using spectral reflectance and thermal imaging // Func. Plant Biol. 2017. V. 44. P. 312–323.

84. Knapp A.K., Carter G.A. Variability in leaf optical properties among 26 species from a broad range of habitats // Am. J. Bot. 1998. V. 85. P. 940–946.

85. Kokaly R.F., Despain D.G., Clark R.N., Livo K.E. Mapping vegetation in Yellowstone National Park using spectral feature analysis of AVIRIS data // Remote Sens. Environ. 2003.
V. 84. P. 437–456.

86. Kováč D., Malenovský Z., Urban O., Špunda V., Kalina J., Ač A., Kaplan V., Hanuš J. Response of green reflectance continuum removal index to the xanthophyll de-epoxidation cycle in Norway spruce needles // J. Exp. Bot. 2013. V. 64. P. 1817–1827.

87. Kováč D., Veselá B., Klem K., Večeřová K., Kmecová Z.M., Peñuelas J., Urban O. Correction of PRI for carotenoid pigment pools improves photosynthesis estimation across different irradiance and temperature conditions // Remote Sens. Environ. 2020. V. 244. Article 111834.

88. Kováč D., Veselovská P., Klem K., Večeřová K., Ač A., Peñuelas J., Urban O. Potential of photochemical reflectance index for indicating photochemistry and light use efficiency in leaves of European beech and Norway spruce trees // Remote Sens. 2018. V. 10. Article 1202.

89. Krausko M., Perutka Z., Šebela M., Šamajová O., Šamaj J., Novák O., Pavlovič A. The role of electrical and jasmonate signalling in the recognition of captured prey in the carnivorous sundew plant *Drosera capensis* // New Phytol. 2017. V. 213. P. 1818–1835.

90. Kress E., Jahns P. The dynamics of energy dissipation and xanthophyll conversion in arabidopsis indicate an indirect photoprotective role of zeaxanthin in slowly inducible and relaxing components of non-photochemical quenching of excitation energy // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. Article 2094.

91. Kume A., Akitsu T., Nasahara K.N. Why is chlorophyll b only used in light-harvesting systems? // J. Plant Res. 2018. V. 131. P. 961–972.

92. Ladeynova M., Mudrilov M., Berezina E., Kior D., Grinberg M., Brilkina A., Sukhov V., Vodeneev V. Spatial and temporal dynamics of electrical and photosynthetic activity and the content of phytohormones induced by local stimulation of pea plants // Plants. 2020. V. 9. Article 1364.

93. Liu C., Liu Y., Guo K., Fan D., Li G., Zheng Y., Yu L., Yang R. Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China // Environ. Exp. Bot. 2011. V. 71. P. 174–183.

94. Lowe A., Harrison N., French A.P. Hyperspectral image analysis techniques for the detection and classification of the early onset of plant disease and stress // Plant Methods. 2017.
V. 13. Article 80.

95. Lu S., Lu X., Zhao W., Liu Y., Wang Z., Omasa K. Comparing vegetation indices for remote chlorophyll measurement of white poplar and Chinese elm leaves with different adaxial and abaxial surfaces // J. Exp. Bot. 2015. V. 66. P. 5625–5637.

96. Ma X., Migliavacca M., Wirth C., Bohn F.J., Huth A., Richter R., Mahecha M.D. Monitoring plant functional diversity using the reflectance and echo from space // Remote Sens. 2020. V. 12. Article 1248.

97. Madani N., Parazoo N.C., Kimball J.S., Ballantyne A.P., Reichle R.H., Maneta, M., Saatchi S., Palmer P.I., Liu Z., Tagesson T. Recent amplified global gross primary productivity due to temperature increase is offset by reduced productivity due to water constraints. AGU Advances. V. 2. Article e2020AV000180.

98. Magney T.S., Vierling L.A., Eitel J.U.H., Huggins D.R., Garrity S.R. Response of high frequency Photochemical Reflectance Index (PRI) measurements to environmental conditions in wheat // Remote Sens. Environ. 2016. V. 173. P. 84–97.

99. Mahlein A.-K. Plant disease detection by imaging sensors—Parallels and specific demands for precision agriculture and plant phenotyping // Plant Dis. 2016. V. 100. P. 241–251.

100. Makarieva A. M., Gorshkov V. G. Biotic pump of atmospheric moisture as driver of the hydrological cycle on land // Hydrol. Earth System Sci. 2007. V. 11. P. 1013–1033.

101. Mancinelli A.L. Light-dependent anthocyanin synthesis: A model system for the study of plant photomorphogenesis // Bot. Rev. 1985. V. 51. P. 107–157.

102. Mansouri M., Javadi S.A., Jafari M., Arzani H. Effect of microrelief and water-table on vegetation dynamics in silty loam saline soils of coastal areas // SN Appl. Sci. 2021. V. 3. Article 381.

103. Maxwell K., Johnson G.N. Chlorophyll fluorescence—a practical guide // J. Exp. Bot.2000. V. 51. P. 659–668.

104. Meroni M., Rossini M., Guanter L., Alonso L., Rascher U., Colombo R., Moreno J. Remote sensing of solar-induced chlorophyll fluorescence: Review of methods and applications // Remote Sens. Environ. 2009. V. 113. P. 2037–2051.

105. Merzlyak M.N., Gitelson A.A., Chivkunova O.B., Rakitin V.Y. Non-destructive optical detection of pigment changes during leaf senescence and fruit ripening // Physiol. Plant. 1999.
V. 106. P. 135–141.

106. Miyake C., Yokota A. Cyclic flow of electrons within PSII in thylakoid membranes // Plant Cell Physiol. 2001. V. 42. P. 508–515.

107. Moorthy I., Miller J.R., Noland T.L. Estimating chlorophyll concentration in conifer needles with hyperspectral data: An assessment at the needle and canopy level // Remote Sens. Environ. 2008. V. 112. P. 2824–2838.

108. Moreira A., Bremm C., Fontana D.C., Kuplich T.M. Seasonal dynamics of vegetation indices as a criterion for grouping grassland typologies // Sci. Agr. 2019. V. 76. P. 24–32.

109. Mousavi S.A., Chauvin A., Pascaud F., Kellenberger S., Farmer E.E. Glutamate receptor-like genes mediate leaf-to-leaf wound signalling // Nature. 2013. V. 500. P. 422–426.

110. Müller P., Li X.-P., Niyogi K.K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy // Plant Physiol. 2001. V. 125. P. 1558–1566.

111. Mulo P. Chloroplast-targeted ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase (FNR): Structure, function and location. Biochim. Biophys. Acta // 2011. V. 1807. P. 927–934.

112. Myneni R.B., Asrar G. Atmospheric effects and spectral vegetation indices // Remote Sens. Environ. 1994. V. 47. P. 390–402.

113. Nilkens M., Kress E., Lambrev P.H., Miloslavina Y., Müller M., Holzwarth A.R., Jahns P. Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady state conditions in *Arabidopsis* // Biochim. Biophys. Acta. 2010. V. 1797. P. 466–475.

114. Ollinger S.V. Sources of variability in canopy reflectance and the convergent properties of plants // New Phytol. 2011. V. 189. P. 375–394.

115. Pastor-Guzman J., Atkinson P., Dash J., Rioja-Nieto R. Spatiotemporal variation in mangrove chlorophyll concentration using Landsat 8 // Remote Sens. 2015. V. 7. P. 14530–14558.

116. Pavlovič A., Slováková L., Pandolfi C., Mancuso S. On the mechanism underlying photosynthetic limitation upon trigger hair irritation in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula Ellis*) // J. Exp. Bot. 2011. V. 62. P. 1991–2000.

117. Pedrós R., Moya I., Goulas Y., Jacquemoud S. Chlorophyll fluorescence emission spectrum inside a leaf // Photochem. Photobiol. Sci. 2008. V. 7. P. 498–502.

118. Penuelas J., Baret F., Filella I. Semi-empirical indices to assess carotenoids/chlorophylla ratio from leaf spectral reflectance // Photosynthetica 1995b. V. 31. P. 221–230.

119. Peñuelas J., Filella I. Visible and near-infrared reflectance techniques for diagnosing plant physiological status // Trends Plant Sci. 1998. V. 3. P. 151–156.

120. Peñuelas J., Filella I., Gamon J.A. Assessment of photosynthetic radiation-use efficiency with spectral reflectance // New Phytol. 1995a. V. 131. P. 291–296.

121. Peñuelas J., Gamon J.A., Fredeen A.L., Merino J., Field C.B. Reflectance indices associated with physiological changes in nitrogen- and water-limited sunflower leaves // Remote Sens. Environ. 1994. V. 48. P. 135–146.

122. Peñuelas J., Marino G., Llusia J., Morfopoulos C., Farré-Armengol G., Filella I. Photochemical reflectance index as an indirect estimator of foliar isoprenoid emissions at the ecosystem level // Nat. Commun. 2013. V. 4. Article 2604.

123. Penuelas J., Pinol J., Ogaya R., Filella I. Estimation of plant water concentration by the reflectance Water Index WI (R900/R970) // Int. J. Remote Sens. 1997. V. 18. P. 2869–2875.

124. Pfannschmidt T., Bräutigam K., Wagner R., Dietzel L., Schröter Y., Steiner S., Nykytenko A. Potential regulation of gene expression in photosynthetic cells by redox and energy state: Approaches towards better understanding // Ann. Bot. 2009. V. 103. P. 599–607.

125. Pizarro L., Stange C. Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants // Cien. Inv. Agrar. 2009. V. 36. P. 143–162.

126. Plesoianu A.I., Stupariu M.S., Sandric I., Patru-Stupariu I., Dragut L. Individual treecrown detection and species classification in very high-resolution remote sensing imagery using a deep learning ensemble model // Remote Sens. 2020. V. 12. Article 2426.

127. Porcar-Castell A., Garcia-Plazaola J.I., Nichol C.J., Kolari P., Olascoaga B., Kuusinen N., Fernández-Marín B., Pulkkinen M., Juurola E., Nikinmaa E. Physiology of the seasonal relationship between the photochemical reflectance index and photosynthetic light use efficiency // Oecologia. 2012. V. 170. P. 313–323.

128. Porcar-Castell A., Tyystjärvi E., Atherton J., van der Tol C., Flexas J., Pfündel E.E., Moreno J., Frankenberg C., Berry J.A. Linking chlorophyll a fluorescence to photosynthesis for remote sensing applications: Mechanisms and challenges // J. Exp. Bot. 2014. V. 65. P. 4065–4095.

129. Ptushenko O.S., Ptushenko V.V., Solovchenko A.E. Spectrum of light as a determinant of plant functioning: A historical perspective // Life. 2020. V. 10. Article 25.

130. Rascher U., Nedbal L. Dynamics of photosynthesis in fluctuating light // Curr. Opin.Plant Biol. 2006. V. 9. P. 671–678.

131. Retkute R., Smith-Unna S.E., Smith R.W., Burgess A.J., Jensen O.E., Johnson G.N., Preston S.P., Murchie E.H. Exploiting heterogeneous environments: does photosynthetic acclimation optimize carbon gain in fluctuating light? // J. Exp. Bot. 2015. V. 66. P. 2437–2447.

132. Roeske C.A., Chollet R. Role of metabolites in the reversible light activation of pyruvate, orthophosphate dikinase in *Zea mays* mesophyll cells *in Vivo* // Plant Physiol. 1989. V.
90. P. 330-337.

 Rondeaux G., Steven M., Baret F. Optimization of soil-adjusted vegetation indices // Remote Sens. Environ. 1996. V. 55. P. 95–107.

134. Rouse J.W., Haas R., Schell J., Deering D. Monitoring vegetation systems in the great plains with ERTS // NASA Spec. Public. 1974. V. 351. P. 309–317.

135. Ruban A.V. Evolution under the sun: optimizing light harvesting in photosynthesis // J.Exp. Bot. 2015. V. 66. P. 7–23.

136. Ruban A.V. Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage // Plant Physiol. 2016. V. 170. P. 1903–1916.

137. Salamati N., Larlus D., Csurka G., Süsstrunk S. Semantic image segmentation using visible and near-infrared channels // Computer Vision—ECCV 2012. Workshops and Demonstrations; ECCV 2012. Lecture Notes in Computer Science; Fusiello A., Murino V., Cucchiara R., Eds. Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2012.

138. Saraiva G.F.R., Ferreira A.S., Souza G.M. Osmotic stress decreases complexity underlying the electrophysiological dynamic in soybean // Plant Biol. 2017. V. 19. P. 702-708.

139. Schlemmer M., Gitelson A., Schepers J., Ferguson R., Peng Y., Shanahana J., Rundquist D. Remote estimation of nitrogen and chlorophyll contents in maize at leaf and canopy levels // Int. J. Appl. Earth Obser. Geoinform. 2013. V. 25. P. 47–54.

140. Schreiber U., Klughammer C. New accessory for the DUAL-PAM-100: The P515/535 module and examples of its application // PAM Application Notes. 2008. V. 1. P. 1–10.

141. Schwieterman E.W. Surface and Temporal Biosignatures // Handbook of Exoplanet; Deeg H., Belmonte J., Eds. Springer: Cham, Switzerland, 2018. P. 2–26.

142. Simmi F.Z., Dallagnol L.J., Ferreira A.S., Pereira D.R., Souza G.M. Electrome alterations in a plant-pathogen system: Toward early diagnosis // Bioelectroch. 2020. V. 133. Article 107493.

143. Sims D.A., Gamon J.A. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages // Remote Sens. Environ. 2002. V. 81. P. 337–354.

144. Song Q., Wang Y., Qu M., Ort D.R., Zhu X.G. The impact of modifying photosystem antenna size on canopy photosynthetic efficiency - Development of a new canopy photosynthesis model scaling from metabolism to canopy level processes // Plant Cell Environ. 2017. V. 40. P. 2946-2957.

145. Soudani K., Hmimina G., Dufrêne E., Berveiller D., Delpierre N., Ourcival J.M., Rambal S., Joffre R. Relationships between photochemical reflectance index and light-use efficiency in deciduous and evergreen broadleaf forests // Remote Sens. Environ. 2014. V. 144. P. 73– 84.

146. Stanković B., Davies E. Both action potentials and variation potentials induce proteinase inhibitor gene expression in tomato // FEBS Lett. 1996. V. 390. P. 275–279.

147. Stratoulias D., Balzter H., Zlinszky A., Tóth V.R. Assessment of ecophysiology of lake shore reed vegetation based on chlorophyll fluorescence, field spectroscopy and hyperspectral airborne imagery // Remote Sens. Environ. 2015. V. 157. P. 72–84.

148. Sukhov V. Electrical signals as mechanism of photosynthesis regulation in plants // Photosynth. Res. 2016. V.130. P. 373–387.

149. Sukhov V., Nerush V., Orlova L., Vodeneev V. Simulation of action potential propagation in plants // J. Theor. Biol. 2011. V. 291. P. 47-55.

150. Sukhov V., Sherstneva O., Surova L., Katicheva L., Vodeneev V. Proton cellular influx as a probable mechanism of variation potential influence on photosynthesis in pea // Plant Cell Environ. 2014. V. 37. P. 2532–2541.

151. Sukhov V., Surova L., Morozova E., Sherstneva O., Vodeneev V. Changes in H⁺-ATP synthase activity, proton electrochemical gradient, and pH in pea chloroplast can be connected with variation potential // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. Article 1092.

152. Sukhov V., Surova L., Sherstneva O., Katicheva L., Vodeneev V. Variation potential influence on photosynthetic cyclic electron flow in pea // Front. Plant Sci. 2015. V. 5. Article 766.

153. Sukhov V., Vodeneev V. A mathematical model of action potential in cells of vascular plants // J Membrane Biol. 2009. V. 232. P. 59–67.

154. Sukhova E., Ratnitsyna D., Sukhov V. Stochastic spatial heterogeneity in activities of H⁺-ATP-ases in electrically connected plant cells decreases threshold for cooling-induced electrical responses // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. Article 8254.

155. Sun H., Feng M., Xiao L., Yang W., Wang C., Jia X., Zhao Y., Zhao C., Muhammad S.K., Li D. Assessment of plant water status in winter wheat (*Triticum aestivum L.*) based on canopy spectral indices // PLoS ONE 2019. V. 14. Article e0216890.

156. Sun P., Wahbi S., Tsonev T., Haworth M., Liu S., Centritto M. On the use of lea spectral indices to assess water status and photosynthetic limitations in olea europaea l. during water-stress and recovery // PLoS ONE 2014. V. 9. Article e105165.

157. Sun Z., Wang X., Wang Z., Yang L., Xie Y., Huang Y. UAVs as remote sensing platforms in plant ecology: Review of applications and challenges // J. Plant Ecol. 2021. V. 14. P. 1003–1023.

158. Surova L., Sherstneva O., Vodeneev V., Katicheva L., Semina M., Sukhov V. Variation potential-induced photosynthetic and respiratory changes increase ATP content in pea leaves // J. Plant Physiol. 2016. V. 202. P. 57–64.

159. Tholen D., Zhu X.-G. The mechanistic basis of internal conductance: a theoretical analysis of mesophyll cell photosynthesis and CO₂ diffusion // Plant Physiol. 2011. V. 156. P. 90-105.

160. Tian J., Wang L., Li X., Gong H., Shi C., Zhong R., Liu X. Comparison of UAV and-WorldView-2 imagery for mapping leaf area index of mangrove forest // Int. J. Appl. Earth Obs. Geoinform. 2017. V. 61. P. 22–31.

161. Tikkanen M., Grieco M., Nurmi M., Rantala M., Suorsa M., Aro E.-M. Regulation of the photosynthetic apparatus under fluctuating growth light // Philos. Trans. R. Soc. B. 2012. V. 367. P. 3486–3493.

162. Ullah A., Manghwar H., Shaban M., Khan A.H., Akbar A., Ali U., Ali E., Fahad S. Phytohormones enhanced drought tolerance in plants: a coping strategy // Environ. Sci. Poll. Res. 2018. V. 25. P. 33103–33118.

163. Ustin S.L., Gamon J.A. Remote sensing of plant functional types // New Phytol. 2010.V. 186. P. 795–816.

164. Ustin S.L., Middleton E.M. Current and near-term advances in Earth observation for ecological applications // Ecol. Process. 2021. V. 10. Article 1.

165. Vicente-Serrano S.M., Camarero J.J., Olano J.M., Martín-Hernández N., Peña-Gallardo M., Tomás-Burguera M., Gazol A., Azorin-Molina C., Bhuyan U., El Kenawy A. Diverse relationships between forest growth and the Normalized Difference Vegetation Index at a global scale // Remote Sens. Environ. 2016. V. 187. P. 14–29.

166. Vilfan N., Van der Tol C., Yang P., Wyber R., Malenovský Z., Robinson S.A., Verhoef
W. Extending Fluspect to simulate xanthophyll driven leaf reflectance dynamics // Remote
Sens. Environ. 2018. V. 211. P. 345–356.

167. von Caemmerer S., Farquhar G., Berry J. Biochemical Model of C₃ Photosynthesis // Photosynthesis *in silico*. Advances in Photosynthesis and Respiration. Laisk A., Nedbal L., Govindjee, Eds. Dordrecht: Springer, 2009. P. 209-230.

168. Wang N., Fu F., Wang H., Wang P., He S., Shao H., Ni Z., Zhang X. Effects of irrigation and nitrogen on chlorophyll content, dry matter and nitrogen accumulation in sugar beet (*Beta vulgaris L.*) // Sci. Rep. 2021. V. 11. Article 16651.

169. Wang Z., Li G., Sun H., Ma L., Guo Y., Zhao Z., Gao H., Mei L. Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves // Biology Open. 2018. V. 7. Article bio.035279. 170. Winter H., Robinson D.G., Heldt H.W. Subcellular volumes and metabolite concentrations // Planta. 1994. V. 193. P. 530-535.

171. Wu A., Doherty A., Farquhar G.D., Hammer G.L. Simulating daily field crop canopy photosynthesis: an integrated software package // Funct. Plant. Biol. 2018. V. 45. P. 362-377.

172. Wu C., Huang W., Yang Q., Xie Q. Improved estimation of light use efficiency by removal of canopy structural effect from the photochemical reflectance index (PRI) // Agric. Ecosyst. Environ. 2015. V. 199. P. 333–338.

173. Wu C., Niu Z., Tang Q., Huang W. Predicting vegetation water content in wheat using normalized difference water indices derived from ground measurements // J. Plant Res. 2009.
V. 122. P. 317–326.

174. Xie M., Wang Z., Huete A., Brown L.A., Wang H., Xie Q., Xu X., Ding Y. Estimating peanut leaf chlorophyll content with dorsiventral leaf adjusted indices: Minimizing the impact of spectral differences between adaxial and abaxial leaf surfaces // Remote Sens. 2019. V. 11. Article 2148.

175. Xue J., Su B. Significant remote sensing vegetation indices: A review of developments and applications // J. Sens. 2017. V. 2017. P. 2–17.

176. You W., Wang Z., Lu F., Zhao Y., Lu S. Spectral indices to assess the carotenoid/chlorophyll ratio from adaxial and abaxial leaf reflectance // Spectr. Lett. 2017. V. 50. P. 387–393.

177. Zaks J., Amarnath K., Kramer D.M., Niyogi K.K., Fleming G.R. A kinetic model of rapidly reversible nonphotochemical quenching // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 15757–15762.

178. Zhang C., Filella I., Garbulsky M.F., Peñuelas J. Affecting factors and recent improvements of the photochemical reflectance index (PRI) for remotely sensing foliar, canopy and ecosystemic radiation-use efficiencies // Remote Sens. 2016. V. 8. Article 677.

179. Zhang F., Zhou G. Estimation of vegetation water content using hyperspectral vegetation indices: A comparison of crop water indicators in response to water stress treatments for summer maize // BMC Ecol. 2019. V. 19. Article 18.

180. Zhang R.-H., Rao N.X., Liao K.N. Approach for a vegetation index resistant to atmospheric effect // Acta Bot. Sin. 1996. V. 38. P. 53–62.

181. Zhu X., Liu D. Improving forest aboveground biomass estimation using seasonal Landsat NDVI time-series // ISPRS J. Photogram. Remote Sens. 2015. V. 102. P. 222–231. 182. Zinnert J.C., Nelson J.D., Hoffman A.M. Effects of salinity on physiological responses and the photochemical reflectance index in two co-occurring coastal shrubs // Plant Soil 2012.V. 354. P. 45–55.

183. Zivcak M., Kalaji H. M., Shao H.-B., Olsovska K., Brestic M. Photosynthetic proton and electron transport in wheat leaves under prolonged moderate drought stress // J. Photo-chem. Photobiol. B Biol. 2014. V. 137. P. 107–115.