

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СКОРОСТИ АССИМИЛЯЦИИ CO₂ У ОДНОЛЕТНИХ ВИДОВ *Trifolium* НА ЮВЕНИЛЬНОМ ЭТАПЕ ОНТОГЕНЕЗА*

Е. В. Думачева, доктор биологических наук
С. И. Костенко, кандидат сельскохозяйственных наук
В. И. Чернявских, доктор сельскохозяйственных наук
Ю. В. Печегина, А. А. Гребенников

ФНЦ «ВИК им. В. Р. Вильямса», г. Лобня Московской области, Россия,
laboratory_ph@mail.ru

Изучены параметры фотосинтеза, темнового дыхания и межклеточной концентрации CO₂ у трех видов однолетних клеверов: *Trifolium resupinatum*, *T. alexandrinum*, *T. incarnatum*. В опыте установлены существенные отличия параметров скорости ассимиляции углекислого газа между изученными видами. Максимальная величина темнового дыхания и скорости ассимиляции CO₂ отмечена у семядольных листьев проростков *T. alexandrinum*. Рассчитаны уравнения световых кривых ассимиляции CO₂ и концентрация межклеточного CO₂. Установлены высокие коэффициенты аппроксимации: для световых кривых фотосинтеза от 0,945 до 0,989; для концентраций межклеточного CO₂ — от 0,683 до 0,983.

Ключевые слова: *Trifolium resupinatum*, *Trifolium alexandrinum*, *Trifolium incarnatum*, фотосинтез, темновое дыхание, межклеточная концентрация CO₂.

Однолетние виды рода *Trifolium*: *Trifolium resupinatum*, *T. alexandrinum*, *T. incarnatum* — модельные объекты быстрорастущих бобовых трав с прохождением фаз онтогенеза в течение одного вегетационного сезона, перспективные для интродукции в связи с возросшим интересом к ним как ценным однолетним кормовым культурам полифункционального назначения [1–3].

Интерес к однолетним клеверам как к кормовым растениям связан с возможностью использовать их для производства высокобелкового корма [4–6].

*Исследование выполнено при поддержке Нацпроекта «Наука и университеты»: Грант 31.05.2021 г. № 075-15-2021-541 (внутренний номер 09.ССЦ.21.0008) на создание и развитие «Центра по кормовым культурам для создания и внедрения в агропромышленный комплекс современных технологий на основе собственных разработок Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии имени В. Р. Вильямса» (ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»); Госзадание FGGW-2022-0013 «Разработка теоретических основ ускорения интродукции, селекции и повышения эффективности семеноводства сельскохозяйственных растений на основе оценки сопряженности фундаментальных физиологических процессов».

Показана способность однолетних клеверов аккумулировать тяжелые металлы и нефтезагрязнения [7].

Все эти ценные свойства позволяют рассматривать виды однолетних клеверов как модельные объекты для изучения физиологических аспектов формирования адаптационных механизмов устойчивости к засолению и закислению почвенного субстрата. Устойчивость однолетних и многолетних бобовых трав к разнообразным абиотическим стрессорам является важнейшим направлением современных научных исследований [8–10].

Клевер опрокинутый (персидский, шабдар) (*T. resupinatum* L.) — однолетнее растение высотой в среднем от 20 до 30 см. Его розовые цветки собраны в шарообразное соцветие — головку. Длительность вегетации составляет от 80 до 135 суток в зависимости от условий произрастания. Урожайность сена в южных регионах — от 6,5–7 до 8–10 т/га. Содержание протеина достигает 17–18 %. Посев проводят рано. Норма высева при орошении — 15 кг/га. Глубина посева — 1–2 см. В Закавказье возможны осенние посевы в октябре. К уборке на сено приступают в начале цветения. На семена — при побурении 70–80 % головок раздельным способом. При семенной культуре шабдар скашивают сенокосилками и укладывают массу в валки. При подсыхании массы обмолачивают комбайном. Также возможна уборка на семена прямым комбайнированием. Клевер персидский хорошо подходит для пожнивных посевов.

Клевер александрийский (*T. alexandrinum* L.) — однолетнее растение. Корневая система хорошо развита. Стебли прямые, ветвятся, высота растений — 25–60 см. Соцветие — овально-коническая головка. Цветки желтовато-белого цвета. Масса 1000 семян — 2,5–3,0 г. Вегетационный период длится 90–120 дней. Высевают осенью или ранней весной. Норма высева — 15–18 кг/га. Глубина посева — до 2 см. Позволяет получать 2–3 укоса. Способен формировать урожай зеленой массы до 12 т/га. Сено и зеленая масса клевера александрийского хорошо поедаются всеми видами животных.

Клевер мясо-красный (инкарнатный) (*T. incarnatum* L.) — травянистый однолетник, имеющий высоту от 20 до 50 см, чаще не ветвистый. *T. incarnatum* обладает высокой декоративностью в период цветения. Его насыщенно красные или темно-красные цветки образуют соцветие — удлиненную головку высотой от 3 до 5–6 см и шириной до 1–1,5 см.

В настоящее время при оценке эффективности интродукции новых видов рекомендуют использовать данные по динамике чистой скорости фотосинтеза, проводимости устьиц, межклеточных концентраций CO₂, скорости транспирации и эффективности водопользования в новых

условиях выращивания на различных стадиях онтогенеза [11; 12]. Изучают физиологические реакции видов на широкий спектр стрессовых воздействий: избыточное или недостаточное увлажнение, условия засоления, избытка алюминия и другие. Известен способ оценки диапазона саморегуляции фотосинтетического аппарата путем изменения условий освещения — от полной темноты до избыточных величин [13]. Зависимость скорости фотосинтеза от освещенности характеризуется рядом параметров, которые часто используются для сравнения видов или для нахождения взаимосвязей фотосинтеза с другими физиологическими процессами. Для правильной оценки этих параметров рекомендуют измерять скорость фотосинтеза, темнового дыхания, оценивать точку компенсации освещенности и ряд других параметров в течение онтогенеза, начиная со стадии проростков. В связи с этим целью наших исследований было изучить особенности процессов ассимиляции CO_2 у видов однолетних клеверов на стадии проростков.

Методика исследований. Исследования проводили с использованием стандартных методов, принятых в физиологии растений для опытов в водной культуре [11–13]. Повторность в опыте трехкратная. Перед проращиванием семена были скарифицированы, стерилизованы этанолом (96 %). Для прорастания семена были помещены в чашки Петри на фильтровальную бумагу в климатокамеру при температуре 24 °С. Проростки освещали светодиодными лампами ULTRAFLASH: длина волны в красной части спектра — 650 нм, синем — 450 нм, инфракрасном — 750 нм; фотосинтетически активное излучение — 26 μmol , фотосинтетически активное излучение в секунду — 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ при 26 ± 2 °С. Проростки находились в режиме «14 ч света – 10 ч темноты».

Исследование процессов фотосинтеза и темнового дыхания проводили на семядольных листьях с использованием портативной системы измерения газообмена растений. Для определения интенсивности дыхания, фотосинтеза и межклеточной концентрации CO_2 семядольные листья исследуемых культур помещали в термостатируемую листовую камеру портативной системы измерения газообмена растений (модель LI-6800, LI-COR, США; прибор приобретен при финансовой поддержке гранта на создание селекционно-семеноводческого центра ФНЦ «ВИК им. В. Р. Вильямса»).

Для получения данных о зависимости параметров фотосинтеза от интенсивности фотосинтетически активной радиации (ФАР) устанавливали в камере концентрацию CO_2 на уровне 400 $\mu\text{M}/\text{M}$. Интенсивность фотосинтетически активной радиации (ФАР) в камере прибора изменялась: 1500, 1000, 500, 200, 100, 50, 0 $\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{с}$. Температура в листовой камере поддерживалась в диапазоне 24–26 °С. За величину темнового

дыхания принимали значение ассимиляции CO_2 при ФАР, равном нулю [14–16].

Площадь листьев определяли с использованием автоматизированной программы Retiol. Статистический анализ результатов полевых и лабораторных опытов проводили с помощью пакета прикладных программ Excel, анализа ANOVA.

Результаты. Ведется дискуссия выбора этапа онтогенеза, наиболее полно отражающего включение начальных этапов адаптационных процессов и процессов саморегуляции при проведении комплексной оценки селекционного материала. Все большее число исследователей склоняются к необходимости разработки неинвазивных методов оценки исходных форм на ранних этапах онтогенеза [17]. Стадия семени (se) является латентным онтогенетическим периодом, стадия проростка (p) — первой фазой прегенеративного периода. Указывают на ценность данных, полученных на семядольных листьях [18]. В связи с этим изучение процессов фотосинтеза и транспирации у видов однолетних клеверов проводили на семядольных листьях проростков.

Информацию о степени устойчивости фотосинтетического аппарата к комплексу абиотических факторов в естественных условиях дают световые кривые фотосинтеза и сопутствующих процессов газообмена [19; 20]. Их предлагают рассматривать как основной показатель при сравнении параметров процессов ассимиляции углерода у различных культур в естественных условиях [21; 22].

В таблице 1 приведены результаты изучения интенсивности темнового дыхания и ассимиляции CO_2 у семядольных листьев однолетних видов *Trifolium* в зависимости от интенсивности ФАР.

1. Интенсивность темнового дыхания и фотосинтеза у семядольных листьев однолетних видов *Trifolium* в зависимости от интенсивности ФАР, $\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{c}$

ФАР, $\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{c}$	<i>T. alexandrinum</i>			<i>T. incarnatum</i>			<i>T. resupinatum</i>		
	M	m	Cv	M	m	Cv	M	m	Cv
0	-2,50	0,84	43,9	-0,52	0,3	92,6	-1,32	0,34	83,7
50	0,35	1,13	63,3	0,14	0,1	89,5	0,12	0,62	74,0
150	1,07	0,13	16,4	0,69	0,4	89,3	0,94	0,77	106,8
300	4,94	1,58	42,0	1,79	0,2	16,1	2,65	1,80	90,2
600	6,67	2,59	51,3	2,84	0,8	44,6	3,42	1,61	69,1
900	9,27	2,89	44,3	3,07	1,2	52,5	3,61	2,04	74,3
1200	12,75	4,10	47,6	3,86	1,6	58,2	5,23	2,99	79,0
1500	12,41	4,33	49,0	3,60	1,6	63,2	4,01	2,19	71,1

Интенсивность темнового дыхания при отсутствии освещения изменялась у видов клевера в диапазоне от 0,52 до 2,5 $\mu\text{M CO}_2/\text{m}^2/\text{c}$ при уровне $\text{Cv} = 43,9\text{--}92,6\%$. Максимальная величина темнового дыхания отмечена у *T. alexandrinum*: в 4,8 раза выше, чем у *T. incarnatum*, и в 1,9 раза, чем у *T. resupinatum*. При этом между видами установлена существенная разница по интенсивности дыхания, что является указанием на разницу в направленности метаболических процессов в период прорастания семян [17; 22].

Для *T. alexandrinum* характерны и более высокие значения интенсивности ассимиляции CO_2 по сравнению с другими видами, особенно при высоких уровнях ФАР. Сравнительный анализ показал, что интенсивность фотосинтеза у семядольных листьев *T. alexandrinum* при интенсивности ФАР в диапазоне 300–1500 $\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{c}$ существенно превышала показатели для *T. incarnatum*: в 2,76–3,45 раза. При этом точка светового насыщения у этих видов отмечена при ФАР 1200 $\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{c}$.

При сравнении интенсивности фотосинтеза у видов *T. alexandrinum* и *T. resupinatum* существенные различия стали обнаруживаться только при ФАР 900 и сохранялись до освещенности 1500 $\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{c}$. Разница между видами составила 2,44–3,1 раза. Обращает на себя внимание высокий уровень варьирования показателя во всех вариантах опыта: Cv изменялся в пределах от 16,4 до 63,3 % у *T. alexandrinum*; от 16,1 до 89,5 % и достигал максимальных значений у *T. incarnatum* — от 71,1 до 106,8 %.

Световые кривые интенсивности ассимиляции CO_2 с высоким коэффициентом аппроксимации для всех изученных видов клевера описываются уравнениями полинома третьего порядка (табл. 2).

2. Уравнения световых кривых интенсивности фотосинтеза для семядольных листьев однолетних видов *Trifolium*

Вид	Уравнение световой кривой	Коэффициент аппроксимации, R^2
<i>T. alexandrinum</i>	$4\text{E-}09x^3 - 2\text{E-}05x^2 + 0,025x - 2,667$	0,977
<i>T. incarnatum</i>	$2\text{E-}09x^3 - 7\text{E-}06x^2 + 0,009x - 0,505$	0,989
<i>T. resupinatum</i>	$3\text{E-}09x^3 - 1\text{E-}05x^2 + 0,014x - 1,328$	0,945

Уровень содержания CO_2 в межклеточном пространстве — это пул запасного ассимиляционного материала для биохимического этапа фотосинтеза. Отмечают, что более высокая концентрация межклеточного CO_2 соответствует снижению скорости ассимиляционных процессов. В наших опытах существенной разницы по концентрации CO_2 в межклеточном пространстве семядольных листьев различных видов клевера

не установлена на фоне сравнительно низких показателей коэффициента вариации — от 1,8 до 8,3 % у *T. alexandrinum* (табл. 3).

3. Сравнительный анализ концентрации межклеточного CO₂ у семядольных листьев однолетних видов *Trifolium* в зависимости от интенсивности ФАР

ФАР, μМ/м ² /с	<i>T. alexandrinum</i>			<i>T. incarnatum</i>			<i>T. resupinatum</i>		
	М	m	Cv	М	m	Cv	М	m	Cv
0	309,0	14,8	4,8	395,9	10,9	3,7	352,9	59,6	22,3
50	343,0	20,8	7,7	383,2	3,7	1,3	375,3	23,7	8,3
150	344,1	8,1	2,9	364,7	8,6	3,4	365,6	20,9	7,6
300	342,0	4,6	1,8	333,9	14,9	5,9	314,7	37,2	15,8
600	331,4	19,3	8,3	315,4	12,3	5,2	319,2	27,0	11,0
900	320,9	16,3	7,4	312,7	7,01	2,9	326,3	25,0	10,4
1200	310,7	15,2	6,8	297,8	13,4	6,2	307,8	39,4	17,0
1500	319,7	9,7	4,4	306,4	11,4	5,3	330,9	15,6	6,8

Световые кривые межклеточной концентрации CO₂ с высоким коэффициентом аппроксимации (R²) для всех изученных видов клевера описываются уравнениями полинома третьего порядка (табл. 4).

4. Уравнения световых кривых межклеточной концентрации CO₂ для семядольных листьев однолетних видов *Trifolium*

Вид	Уравнение световой кривой	Коэффициент аппроксимации, R ²
<i>T. alexandrinum</i>	$-6E-08x^3 + 0,000x^2 - 0,242x + 405,5$	0,978
<i>T. incarnatum</i>	$-6E-08x^3 + 0,000x^2 - 0,239x + 394,6$	0,983
<i>T. resupinatum</i>	$-2E-08x^3 + 0,000x^2 - 0,135x + 367,6$	0,683

Заключение. Таким образом, установлены существенные отличия параметров скорости ассимиляции углекислого газа у видов *T. resupinatum*, *T. alexandrinum*, *T. incarnatum*. Максимальная величина темнового дыхания и скорости ассимиляции CO₂ отмечена у семядольных листьев проростков *T. alexandrinum*. Рассчитаны уравнения световых кривых ассимиляции CO₂ и концентрации межклеточного CO₂. Установлены высокие коэффициенты аппроксимации: для световых кривых фотосинтеза от 0,945 до 0,989; для концентраций межклеточного CO₂ — от 0,683 до 0,983.

Литература

1. Многолетние травы для пастбищ, газонов и рекультивации: селекция и практика / В. М. Косолапов, С. И. Костенко, Е. В. Думачева, В. И. Чернявских // Кормопроизводство. – 2022. – № 10. – С. 14–17.
2. Думачева Е. В., Чернявских В. И. Биоресурсный потенциал бобовых трав на меловых обнажениях и карбонатных почвах Европейской России. – Белгород : Издательский дом «Белгород», 2014. – 144 с. – ISBN 978-5-9571-0914-3.
3. Бекузарова С. А., Трифонова М. Ф., Осикина Р. В. Характеристика видов клевера на Северном Кавказе // Известия Международной академии аграрного образования. – 2016. – № 30. – С. 113–119.
4. Дробышева Л. В., Зятчина Г. П. Основные результаты селекции различных видов клеверов на повышение эффективности симбиоза // Многофункциональное адаптивное кормопроизводство. – М. : Угрешская типография, 2015. – С. 151–157.
5. Селекция видов клевера на иммунитет в условиях РСО-Алании / И. А. Датиева, Л. М. Келехсашвили, К. Х. Фарниева [и др.] // Аграрная наука. – 2019. – № 5. – С. 49–52. – DOI: 10.32634/0869-8155-2019-325-5-49-52.
6. Бекузарова С. А., Датиева И. А. Оценка однолетних видов клевера на устойчивость к болезням и вредителям // Научные труды Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия. – 2020. – Т. 29. – С. 251–254. – DOI: 10.30679/2587-9847-2020-29-251-254.
7. Бекузарова С. А., Датиева И. А. Снижение загрязненности почв однолетними видами клевера // Известия Горского государственного аграрного университета. – 2018. – Т. 55, № 3. – С. 8–12.
8. Дегтярь О. В., Чернявских В. И. О состоянии степных сообществ юго-востока Белгородской области // Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского. Серия: Биология. – 2004. – № 2. – С. 254–258.
9. Чернявских В. И., Думачева Е. В. Генетическая коллекция многолетних бобовых трав Белгородской области: этапы формирования, пути мобилизации и селекционный потенциал // Успехи современного естествознания. – 2019. – № 1. – С. 63–68.
10. Чернявских В. И., Думачева Е. В. Эффективность совместных посевов козлятника восточного с эспарцетом песчаным на семена // Кормопроизводство. – 2019. – № 12. – С. 21–25.
11. Гавриленко В. Ф., Жигалова Т. В. Большой практикум по фотосинтезу. – Москва : Академия. – 2003. – 256 с.
12. Мокроносов А. Т., Гавриленко В. Ф., Жигалова Т. В. Фотосинтез. Физиолого-экологические и биохимические аспекты. – М. : Академия, 2006. – 448 с.
13. Семихатова О. А., Чиркова Т. В. Физиология дыхания растений : учебное пособие. – СПб : СПб ун-т, 2001. – 220 с.
14. Acclimation of foliar respiration and photosynthesis in response to experimental warming in a temperate steppe in Northern China / Y. Chi, M. Xu, R. Shen, Q. Yang, B. Huang, S. Wan // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8(2). – P. 1–13.
15. Evans J. R., Santiago L. S. Prometheus Wiki gold leaf protocol: gas exchange using LI-COR 6400 // Funktsional'naya biologiya rasteniy. – 2014. – Vol. 41(3). – P. 223–226.
16. Riches M., Lee D., Farmer D. K. Simultaneous leaf-level measurement of trace gas emissions and photosynthesis with a portable photosynthesis system // Atmos. Meas. Tech. – 2020. – Vol. 13, – P. 4123–4139, [https://doi.org/ 10.5194/amt-13-4123-2020](https://doi.org/10.5194/amt-13-4123-2020).

17. Influence of ecological conditions of various habitats on individual morpho-biological and physiological features of *Hedysarum grandiflorum* Pall seeds / L. D. Sajfutdinova, V. M. Kosolapov, V. I. Cherniavskikh, E. V. Dumacheva // Materials V International Youth Applied Research Forum “Oil Capital”: Conference Series “Oil Capital” 23–24 March 2022 Khanty-Mansyisk Autonomous Okrug-Yugra, Russia. – AIP Conf. Proc. – 2023. – Vol. 2929, № 1. – P. 040005. DOI: 10.1063/5.0179494.
18. Evstigneev O. I., Korotkov V. N. Ontogenetic stages of trees: an overview // Russian Journal of Ecosystem Ecology. – 2016. – Vol. 1(2). – P. 1–31. – DOI: 10.21685/2500-0578-2016-2-1.
19. Changes in optical plant parameters with respect to the degree of soil salinity in arid lands / M. K. M. Magomedova, M. Y. Alieva, A. T. Mammaev, E. V. Pinyaskina, A. V. Murtuzova // Arid Ecosystems. – 2019. – 25. – Vol. 2(79). – P. 70–75. – DOI: 10.1134/S2079096119020082.
20. Molchanov A. G. Variability of photosynthetic light curves of tree species // Rossiiskaia Selskokhoziaistvennaia Nauka. Lesovedenie. – 2015. – Vol. 1. – P. 20–26.
21. Влияние условий произрастания сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) на процессы фотосинтеза и транспирации / А. П. Глинушкин, С. М. Хамитова, Н. А. Бабич [и др.] // Хвойные бореальной зоны. – 2022. – Т. 40, № 5. – С. 361–368. – DOI: 10.53374/1993-0135-2022-5-361-368. – EDN INRFEF.
22. Evaluation of the resistance of medicago breeding samples to the action of abiotic stressors at the early stages of ontogenesis / E. V. Dumacheva, L. D. Sajfutdinova, Yu. V. Pechegina [et al.] / II International Conference on Current Issues of Breeding, Technology and Processing of Agricultural Crops, and Environment (CIBTA-II-2023) // BIO Web of Conferences, 010 (2023) CIBTA-II-2023. – P. 01088. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20237101088>.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE RATE OF CO₂ ASSIMILATION IN ANNUAL TRIFOLIUM SPECIES AT THE JUVENILE STAGE OF ONTOGENESIS

**E. V. Dumacheva, S. I. Kostenko,
V. I. Chernyavskikh, Yu. V. Pechegina, A. A. Grebennikov**

*The parameters of photosynthesis, dark respiration and intercellular CO₂ concentration were studied in three species of annual clovers: *Trifolium resupinatum*, *T. alexandrinum*, *T. incarnatum*. Significant differences in the parameters of the rate of carbon dioxide assimilation between the studied species were established in the experiment. The maximum value of dark respiration and CO₂ assimilation rate was observed in the seedling leaves of *T. alexandrinum* seedlings. The equations of light curves of CO₂ assimilation and intercellular CO₂ concentration were calculated. High approximation coefficients were found: from 0.945 to 0.989 for photosynthesis light curves; from 0.683 to 0.983 for intercellular CO₂ concentrations.*

Keywords: *Trifolium resupinatum, Trifolium alexandrinum, Trifolium incarnatum, photosynthesis, dark respiration, intercellular CO₂ concentration.*