

БЫСТРЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ В РАБОТЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА В РАЗЛИЧНЫХ СОРТАХ ПШЕНИЦЫ ПРИ ТЕПЛОВОМ ШОКЕ*

Аннотация. Рассмотрены механизмы действия теплового стресса (42°C) в течение коротких экспозиций (15, 30, 60, 120 минут) на активность фотохимических реакций и концентрации пигментов в различных сортах пшеницы, отличающихся термоустойчивостью. Показано, что в условиях теплового шока в зависимости от длительности теплового воздействия в изученных сортах пшеницы в разной степени снижается активность нециклического фотофосфорилирования (НЦФ), а циклического (ЦФ) увеличивается, что является защитным приспособлением в уменьшении уровня окислительных повреждений. Суммарная концентрация хлорофиллов при действии повышенной температуры в целом изменялась незначительно, гипертермия не влияла также на соотношение хлорофиллов a/b. Концентрация каротиноидов достоверно возросла только после кратковременного (15 минут) теплового воздействия.

Ключевые слова: Тепловой стресс, фотосинтез, хлорофилл, каротиноиды, ферменты, фотосистема I, фотосистема II.

Введение. Одной из самых чувствительных к изменениям окружающей среды функций растительной клетки является фотосинтетическая. Ответная реакция фотосинтетического аппарата развивается довольно быстро и рассматривается как одна из сторон первой фазы неспецифического адаптационного синдрома растений [13]. Действие различных факторов на фотосинтетический аппарат реализуется через весь комплекс физических, фотохимических и ферментативных реакций, возникающие изменения во многом универсальны, их результатом в целом является торможение фотосинтеза.

Сравнительному изучению чувствительности различных видов растений к неблагоприятным воздействиям, в том числе повышенной температуре, посвящено большое количество исследований. Есть мнение, что наибольшей чувствительностью обладают процессы, протекающие на тилакоидных мембранах [16], что связано с одной стороны повышенной вероятностью генерации активных форм кислорода (АФК) при сбоях в работе фотосинтетической электронно-транспортной цепи (ФЭТЦ), а с другой структурными перестройками пигментного аппарата [7; 5]. Изменение пигментного состава, дезагрегация молекул, светособирающих комплексов, приводит в конечном итоге к уменьшению эффективности миграции энергии возбуждения в реакционные центры фотосистем, а, следовательно, повышению вероятности сброса энергии с триплетного хлорофилла на кислород с образованием $1O_2$ [6]. Наиболее эффективно этот процесс протекает с участием мономерных и коротковолновых форм хлорофилла. Кроме хлорофиллов эффективно генерируют $1O_2$, феофитины и порфирины. Синглетному кислороду отводится ведущая роль и при гипертермическом воздействии [2]. Так, фотоокислительную деструкцию компонентов ФСII при повышенной температуре связывают с ингибированием процесса дезактивации каротиноидами триплетных состояний хлорофилла и генерацией синглетного кислорода. Нефотохимическое тушение возбужденного хлорофилла наиболее эффективно осуществляют каротиноиды. Возрастание уровня нефотохимической диссипации энергии в результате превращения виолаксантина в зеаксантин в условиях гипертермии [3; 23] является одной из универсальных реакций адаптации пигментного аппарата к тепловому воздействию.

* © Гамбарова Н.Г.

В связи с вышеизложенным, интересным явилось исследование в условиях гипертермии нарушений в пигментной системе хлоропластов различных сортов пшеницы, отличающихся теплоустойчивостью.

Методы исследований. Объектами исследования служили 14-дневные проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта «Московская-35» (Северная коллекция) и «Шарг» (Южная коллекция), которые проращивали на фильтровальной бумаге, смачиваемой водопроводной водой, в условиях климатической камеры при 22°C и подвергали короткому воздействию теплового шока, помещая в термостат при 42°C на 15, 20, 60 и 120 мин. Хлоропласты выделяли из средней части листьев по методике Арнон с соавт. [16].

Определение скорости циклического фотофосфорилирования (ЦФ). Для характеристики циклического фотофосфорилирования использовали метод регистрации синтеза АТФ по убыли неорганического фосфата в реакционной смеси. В качестве кофакторов использовали ФМС (феназинметасульфат) и диурон. Реакционная смесь содержала: $MgCl_2$ – 3мМ, KH_2PO_4 – 3мМ, ФМС – 0,03мМ, аскорбат Na – 3мМ, АДФ-Na – 3мМ, диурон (дихлорфенил-деметилмочевина) – 5 мкМ, трис-HCl-буфер – 0,02 мМ, суспензию хлоропластов с концентрацией хлорофилла 30-40 мкг/мл (рН 7,7). Активность ЦФ выражали в мкмоль Рн/мг хл·час.

Определение скоростей реакции Хилла и нециклического фотофосфорилирования (НЦФ). Для характеристики реакции Хилла и использовали метод регистрации убыли – феррицианида калия в реакционной смеси, нециклического фотофосфорилирования – по убыли неорганического фосфата в реакционной смеси. Реакционная смесь состояла из: KH_2PO_4 – 3мМ, $MgCl_2$ – 3мМ, $K_3[Fe(CN)_6]$ – 0,3 мМ, АДФ-Na – 3мМ, трис-HCl – буфер – 0,02 М. Концентрация хлорофилла составляла 30-40 мкг/мл (рН 7,7). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при длине волны 420 нм.

Расчет скорости реакции Хилла проводили с использованием коэффициента молярной экстинкции $E=0,97M$. Активность реакции Хилла выражали в мкмоль $K_3[Fe(CN)_6]$ / мг хл·час.

Для определения скорости НЦФ оставшийся в реакционной смеси феррицианид калия осаждали с помощью 1N ацетата Na, 0,8% аскорбиновой кислоты и 0,56% $ZnSO_4$, раствор фильтровали и исследовали содержание неорганического фосфата в фильтрате. Активность НЦФ выражали в мкмоль Рн/мг хл·час.

Определение содержания неорганического фосфата. Концентрацию неорганического фосфата определяли по методу Лоури в модификации Хонда [21].

Определение содержания хлорофилла проводили по [9].

Определение содержания пигментов. Навеску листьев (500 мг) или суспензию хлоропластов (0,2 мл) растирали в 100% ацетоне с добавлением небольшого количества $CaCO_3$. Полученную массу фильтровали и определяли оптическую плотность растворов при длинах волн 663 нм, 645 нм, 440,5 нм. Расчет содержания пигментов проводили по формулам Хольма-Веттштейна для 100% ацетона [9].

Результаты и обсуждение. На рис 1. представлена фотофосфорилирующая активность хлоропластов растений при воздействии гипертермии. Согласно полученным результатам обработка растений пшеницы сорта «Шарг» вызывала рост активности циклического фосфорилирования (рис 1,А). Небольшой – 15-минутный прогрев – сопровождался возрастанием активности этого процесса на 20%, а 30-минутное воздействие почти в 2 раза повышало скорость ЦФ по сравнению с контролем. Дальнейшее увеличение экспозиции теплового шока до 1 и 2 часов приводило к некоторому снижению интенсивности ЦФ, тем не менее, его величина превышала контрольный уровень примерно на 60%. Что касается НЦФ, то 15-минутный тепловой шок вызывал небольшое уменьшение его активности – 9%. Однако, увеличение времени гипертермии до 30 минут и одного

часа приводило к значительному снижению скорости – почти в 2 раза ниже контроля. После двухчасового высокотемпературного воздействия активность НЦФ продолжала уменьшаться и составляла лишь 35% от контрольного уровня.

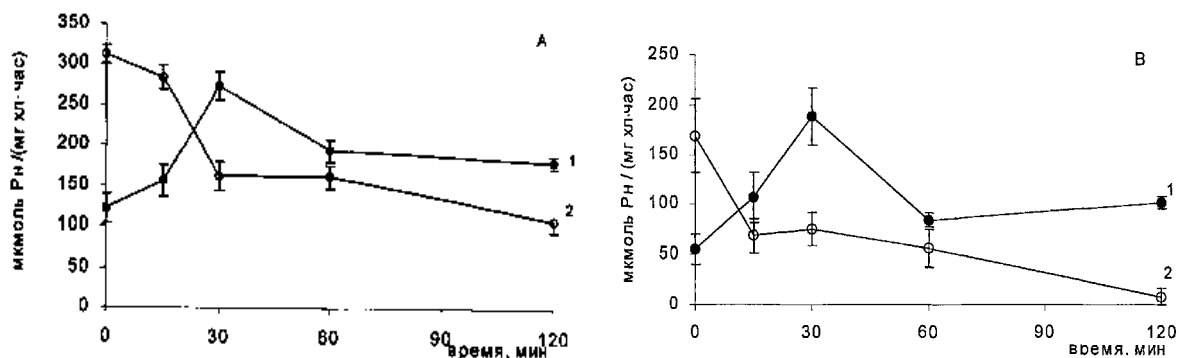


Рис.1. Скорость циклического (1) и нециклического (2) фотофосфорилирования в хлоропластах растений пшеницы при воздействии 42 °С. А - растения пшеницы сорта «Шарг», Б – растения пшеницы сорта «Московская-35».

Изменения скоростей ЦФ и НЦФ при гипертермической обработке растений пшеницы сорта «Московская-35» (рис 1 Б) была следующей: в нестрессированных растениях уровень НЦФ был выше, чем ЦФ, тепловой шок вызывал переключение потоков электронов с нециклического пути на циклический, максимум активности ЦФ также приходился на 30-минутную экспозицию. В качестве отличий, можно отметить, что для пшеницы этого сорта были показаны более низкие скорости ЦФ и НЦФ, по сравнению с сортом «Шарг». Процесс НЦФ в хлоропластах этого сорта пшеницы оказался более термолабильным: значительное снижение его скорости наблюдалось уже при 15-минутной тепловой обработке – примерно на 60%, а после 2-часовой гипертермии его активность была почти нулевой.

Таким образом, тепловой стресс способствовал увеличению интенсивности ЦФ и снижению активности НЦФ при обработке интактных растений в обоих сортах пшеницы и, следовательно, оказывал ингибирующее воздействие на фотосистему II, так как именно НЦФ служит одним из показателей ее функционирования. Наблюдавшееся переключение потоков электронов с нециклического на циклический путь свидетельствует о

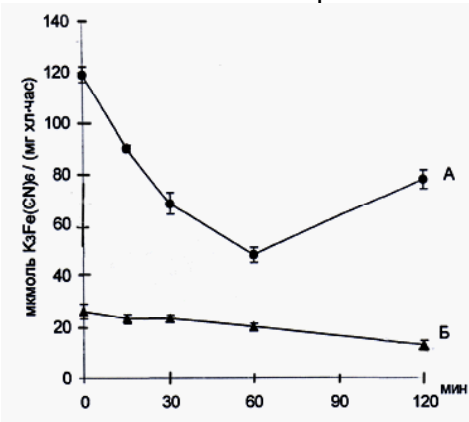


Рис. 2. Скорость реакции Хилла в хлоропластах растений пшеницы при воздействии повышенной температуры (А – сорт «Шарг», Б – сорт «Московская-35»).

перераспределении нагрузок между двумя фотосистемами: подавлении работы более медленной ФСII и активации более быстрой ФСI.

В качестве одной из характеристик работы ФСII растений используют реакцию Хилла, представляющую собой комплекс начальных стадий фотосинтеза, связанных с фотоокислением воды. Согласно рис.2, при тепловой обработке растений пшеницы сорта «Шарг» наблюдалось ее достоверное понижение уже после небольшой 15-минутной экспозиции – на 25%. После 1-часовой обработки – ее активность была минимальной и составляла всего 40% от контрольного уровня. Растения пшеницы сорта «Московская-35» харак-

теризовались самыми низкими абсолютными значениями, однако, они отличались довольно значительной термоустойчивостью: достоверное понижение скорости реакции Хилла было отмечено только при 120-минутном тепловом воздействии (примерно на 50%).

Таким образом, в растениях пшеницы сорта «Шарг» при 15, 30, 60-минутном тепловом шоке происходило одновременное ингибирование НЦФ и реакции Хилла. Эти данные позволяют предположить, что снижение фотосинтетической активности хлоропластов этого сорта при гипертермии в первую очередь определялось сбоями в работе водоокисляющего центра. Сорт пшеницы «Московская-35» обладал большей чувствительностью к термической обработке, и снижение фотосинтеза у него было связано с нарушениями функционирования как водоокисляющего центра, так и ФЭТЦ.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют, что гипертермическая обработка растений способствует снижению активности НЦФ и, следовательно, оказывает ингибирующее воздействие на функционирование ФСII. На фоне подавления работы ФСII происходит увеличение скорости образования АТФ в ходе ЦФ. Изменение соотношения между циклическим и нециклическим потоками электронов при гипертермии в пользу циклического, вероятно, свидетельствует о существенном возрастании роли ЦФ в энергообеспечении растительной клетки и является одним из механизмом адаптации растений к неблагоприятным условиям. Таким образом, недостаток АТФ восполняется в первую очередь за счет циклического фотофосфорилирования как более термостабильного процесса.

Подобное переключение потоков электронов с нециклического на циклический путь ранее мы наблюдали в наших ранних работах при гипертермической обработке в течение длительных экспозиций у разных генотипов растений [4].

Результаты исследования более коротких экспозиций теплового шока позволяют заключить, что этот процесс может происходить довольно быстро, существенно менее 2 часов – уже через 15-30 мин теплового воздействия.

Снижение фотосинтетической активности в условиях высокой температуры может быть связано не только с изменениями скоростей электронного транспорта в хлоропластах, но и с нарушениями в пигментной системе, встроенной в тилакоидную мембрану, что приводит к уменьшению эффективности миграции энергии возбуждения от пигментов-светосборщиков в реакционные центры фотосистем [8]. Из результатов, представленных в таблице, видно, что, суммарная концентрация хлорофиллов во всех исследованных сортах пшеницы при действии повышенной температуры в целом изменялась незначительно – в пределах 12%.

Таблица

Содержание пигментов в хлоропластах гипертермированных растений
(мг/100 г сырой массы)

Варианты опытов	Хлорофилл a+b	Хл a/b	Каротиноиды
Сорт «Шарг»			
Контроль	45,93±2,99	1,31±0,13	12,39±0,48
Гипертермия: 15 мин	40,65±2,97	1,58±0,19	18,45±0,83
30 мин	38,41±1,09	1,20±0,21	12,46±0,75
60 мин	40,22±1,55	1,69±0,29	11,06±0,48
120 мин	43,25±0,88	0,70±0,16	11,45±0,39
Сорт «Московская-35»			
Контроль	99,62±2,06	3,33±0,19	22,18±0,46
Гипертермия: 15 мин	90,31±0,75	3,25±0,16	20,13±0,17

30 мин	96,31±2,92	3,22±0,11	20,44±0,63
60 мин	102,37±1,19	3,19±0,15	20,89±0,13
120 мин	10,233±2,06	3,20±0,09	21,45±0,43

В работе И.М.Кислюк и др. [5] также отмечается небольшое – в пределах 15% - изменение суммарного содержания хлорофиллов (a+b) в растениях пшеницы при гипертермии. Вероятно, такая картина может быть связана с некоторым увеличением скорости биосинтеза хлорофилла, который находится в пределах 30-40оС [1]. Кроме того, незначительные изменения содержания хлорофиллов можно объяснить за счет сгущения цитоплазмы и уменьшения общего содержания воды в листьях при гипертермии [15].

При исследованиях пигментного аппарата по соотношению хлорофиллов (хл a/b), судят не только о чувствительности различных форм хлорофилла к действию неблагоприятных факторов, но и оценивают степень сохранности фотосистем. Считается, что снижение показателя хл a/b может свидетельствовать о повреждениях белков комплекса ФСII и связанной с этим деградацией хлорофилла a [26]. Увеличение же этого отношения говорит о большей функциональной активности светособирающих комплексов как ФСI, так и ФСII и высоким соотношением ФСII/ФСI [22, 27]. Согласно таблице, гипертермия практически не влияла на этот показатель во всех исследованных объектах, только растения пшеницы сорта «Шарг» при 120-минутной обработке характеризовались более низким коэффициентом хл a/b.

Динамика изменения количества каротиноидов, в хлоропластах изученных сортов пшеницы, выявила достоверное увеличение концентрации этих пигментов только у сорта «Шарг» после кратковременного 15-минутного воздействия приблизительно на 49%, при более длительных экспозициях воздействия, концентрация каротиноидов возвращалась к исходному уровню. Так как каротиноиды являются эффективными антиоксидантами [18, 20], а значит вовлечены при окислительном стрессе, сопровождающий тепловой шок, перестройки окислительно-восстановительного равновесия, то зафиксированный 15-минутный пик может свидетельствовать об их участии в регуляторных или сигнальных процессах. В растениях пшеницы сорта «Московская-35» 15-минутный тепловой шок, наоборот, немного (на 10%) снижал количество каротиноидов, затем их концентрация также возвращалась к исходному уровню.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют, что гипертермическая обработка растений способствует снижению активности НЦФ и, следовательно, оказывает ингибирующее воздействие на функционирование ФСII. На фоне подавления работы ФСII происходит увеличение скорости образования АТФ в ходе ЦФ.

Можно предположить, что воздействие повреждающей температуры приводило к изменениям в структуре тилакоидной мембраны, не влияя при этом на общее содержание хлорофилла в светособирающих комплексах, и снижение скорости фотофосфорилирования не связано или мало зависит от перестроек в пигментном аппарате растений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Акимова Г.В., Дмитриева В.И., Нюкпиева К.А. Влияние температуры и освещенности на содержание пигментов в листьях огурца // Эколого-физиологические механизмы устойчивости растений к действию экстремальных температур. Петрозаводск. Карел. Филиал АН СССР, 1978, с.48-80.
2. Антал Т.К., Кауров Ю.Н., Лехимена Л., Давлетшина Л.М., Мерзляк М.Н., Ловягина Е.Р., Белевич Н.П., Иванов И.И., Рубин А.Б. Окислительные процессы в фотосистеме 1 термофильных цианобактерий при высоких температурах // Физиол. растений, 2001, т.48, №5, с. 739-745.
3. Бухов Н.Г., Джигладзе Т.Г. Влияние повышенных температур на фотосинтетическую активность интактных листьев ячменя при низких и высоких освещенностях // Физиол. растений, 2002, т.49, №3, с.371-375.

4. Гамбарова Н.Г., Гинс В.К., Рустамова М.З. Устойчивость молекулярной структуры ферредоксина, пластоцианина, ферредоксин-НАДФ-редуктазы к температурным воздействиям. В сб., «Повышение устойчивости растений», БГУ, 1988, стр.79-84.
5. Кислюк И.М., Бубола Л.С., Васильковский М.Д. Увеличение длины мембран тилакоидов в хлоропластах листьев пшеницы в результате теплового шока // Физиол. растений, 1997, т.44, №1, с.39-44.
6. Красновский А.А. Синглетный кислород: механизмы образования и пути дезактивации в биологических системах // Биофизика, 1994, т.39, №2, с.236-250.
7. Лютова М.И., Тихонов Н.Л. Влияние высокой температуры на процессы электронного транспорта // Биофизика, 1983, т.28, №2, с.284-287.
8. Лютова М.И. Сравнение устойчивости реакции Хилла к высокой температуре и гидролитическим ферментам у двух видов высших растений// Физиол. растений, 1983, т.30, №6, с.1194-1200.
9. Методы биохимического исследования растений//Под ред. А.И.Ермакова, Л.: Агропромиздат, 1987, 430 с.
10. Мерзляк М.Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки. Итоги науки и техники. ВИНТИ, серия физиология растений, 1989, Т.6, стр. 186.
11. Пахомова В.М. Основные положения современной теории стресса и неспецифический адаптационный синдром у растений. Цитология, 1995, Т.37, вып.1/2, с.66-91.
12. Пахомова В.М., Чернов И.А. Некоторые особенности индуктивной фазы неспецифического адаптационного синдрома растений. Физиология растений, 1996, Т.43, №6, с.705-715.
13. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот. Современные методы в биохимии. М.Медицина, 1977, с.63-64.
14. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Методы определения МДА с помощью тиобарбитуровой кислоты. Современные методы в биохимии. М.Медицина, 1977, с.66-68.
15. Шаркова В.Е. Влияние высокой температуры на активность фотосинтеза, реакцию Хилла и некоторых ферментов хлоропластов пшеницы. Физиология растений, 1994, Т.41, №5, с.726-730.
16. Arnon D.L., Allen M.B., Whatly L.B. Photosynthesis by isolated Chloplasts. Genetic concept and comparison of free photochemical reactions. Biochem at Biophys Acta, 1956, V.20, N2, p.449.
17. Bohnert H.J., Helson D.E., Jensen R.Y. Adaptations to environmental stress. Plant Cell, 1995, V.7, p.1099-1111.
18. Garcia-Asua G., Lang H.P., Cogdell R.J., Hunter C.N. Carotenoid diversity: a modular role for the phytoene desaturase step // Trends Plant Sci., 1996. v.3, №11, p.445-449.
19. Choe M., Jackson C., Yu B.P. Lipid peroxidation contributes to age-related membrane rigidity. Free Radical Biol. Med., 1995, V18, №6, p.977-984.
20. Navaux M. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts //Trends Plant Sci., 1998. v.3, №4, p.147-151.
21. Honda S.R. The salt respiration and phosphate contents of barley roots. YBIC, 1956, V31, N2, p.62-86.
22. Jiang C-Z, Rodermeil S.R., Shibles R.M. Regulation of photosynthesis in developing leaves of soybean chlorophyll-deficient mutants// Photosynth. Res., 1997. №51, p.185-192.
23. Loggini B., Scartazza a., Brugnoli E., Navari-Izzo F. Antioxidant defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought// Plant Physiol., 1999, v.119, p.1091-1099.
24. Melis A. Photosystem II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage in vivo? Trends Plans Sci, 199, V2, №2, p.130-135.
25. Pastens C., Hornot I. Effect of high temperature on photosynthesis in beans. I Oxygen evolution and chlorophyll fluorescence. Plant Physiol, 1996, V112, №3, p.1245-1251.
26. Sairam R.K., Srivastava G.C. Induction of oxydative stress and antioxidant activity by hydrogen peroxide treatment in tolerant in tolerant and susceptible wheat genotypes // Biol. Plant., 2000. v.43, №3, p.381-386.
27. Teicher H.B., Moller B.L., Scheller H.V. Photoinhibition of Photosystem I in field-grown barley (*Hordeum vulgare* L.): Induction, recovery and acclimation // Photosynth. Res., 2000. №64, p.53-61.

N.G. Gambarova

RAPID RECONSTRUCTIONS IN THE WORK OF PHOTOSYNTHETIC APPARATUS IN DIFFERENT TYPES OF WHEAT WITH THE THERMAL SHOCK

Abstract: The mechanisms of the action of thermal stress during the short exposures (15, 30, 60, 120 minutes) on the activity of photochemical reactions and concentration of pigments in different types of wheat, which are characterized by thermostability are examined. It is

shown that under the conditions of thermal shock depending on the duration of thermal effect in the studied types of wheat to the different degree is reduced the activity of noncyclic phosphorylation (NTSF), and cyclic (TSF) it increases, what is protective device in the decrease of the level of oxidizing damages. The summary concentration of chlorophylls under the effect of the elevated temperature as a whole changed insignificantly, hyperthermy did not influence also the relationship of chlorophyll a/b. The concentration of carotenoids reliably grew only after short-term (15 minutes) thermal effect.

Key words: thermal stress, photosynthesis, chlorophyll, carotenoids, enzymes, photosystem I, photosystem II.