

С. М. Кочубей, В. В. Шевченко, О. Ю. Бондаренко, И. Д. Панас

Динамика изменений функциональной активности фотосинтетического аппарата растений гороха, вызываемых высокотемпературным стрессом

(Представлено академиком НАН Украины В. В. Моргуном)

Показано, что 5-минутный прогрев растений гороха при 45 °С вызывает падение фотохимической активности почти до нулевого уровня. Существенно уменьшается скорость накопления восстановленных акцепторов электронов в реакционных центрах фотосистемы II. Пролонгация прогрева до 20 мин обуславливает возвращение этих параметров практически до уровня контроля. Полученные данные выявляют новый эффект в начальной стадии адаптации растения к высокотемпературному стрессу.

Механизм адаптации растений к изменяющимся условиям окружающей среды является одной из наиболее актуальных проблем. Фотосинтез представляет одно из важнейших звеньев метаболизма растений, крайне чувствительное к изменениям условий произрастания. Поэтому в раскрытии механизма адаптации центральное место занимает выяснение характера реакции фотосинтетического аппарата на внешние воздействия. Адаптационный процесс растянут во времени, начиная с момента восприятия сигнала определенным рецептором, последующего возникновения ответной реакции и ее пространственно-временного распространения. Заключительным этапом является установление новой структурно-функциональной конфигурации, соответствующей измененным условиям произрастания.

Известны результаты исследований изменений функциональных и структурных показателей, вызванных кратковременным высокотемпературным прогревом [1–5]. Эти исследования были проведены на листьях, отделенных от растений. Нами при изучении начальных стадий акклиматизации к тепловому стрессу были выявлены изменения структуры и функциональных показателей. В частности, в хлоропластах гороха, которые прогревали 5 мин при 45 °С, обнаружены специфические изменения состояния антенных комплексов фотосистем II и I [6, 7]. Показано замедление скорости восстановления первичного акцептора электронов Q_A в ФСII, снижение ее активности [8], а также ускорение окисления фотохимических центров ФСI [9]. Данные работы [5] получены при прогреве 14–16-дневных проростков пшеницы. Исследования с прогревом целых взрослых растений не известны. Отсутствуют также сведения о динамике изменений параметров фотосинтетического аппарата при пролонгировании времени прогрева.

Наша цель состояла в тестировании функциональных изменений фотосинтетического аппарата растений гороха, вызванных высокотемпературным прогревом. При этом осуществляли сканирование во времени, что дало возможность проследить динамику этих изменений в определенном временном интервале.

Растения гороха выращивали в течение двух недель в сосудах с почвой при освещении лампами “Osram, L36W/77 Fluora”. Интенсивность освещенности на уровне растений составляла 12 клк, температура — около 18 °С. Затем сосуды с растениями переставляли в камеру с регулируемой температурой и прогревали при 45 °С при освещении светом

такого же спектрального состава и интенсивностью 15 клк. Верхние полностью сформированные листья отбирали через 5, 10, 20, 40 и 80 мин и проводили измерения индукции флуоресценции хлорофилла. Перед измерениями листья адаптировали в темноте в течение 20 мин. Индукцию флуоресценции определяли как функцию от времени интенсивности флуоресценции при 680 нм. Интенсивность монохроматического актиничного света при 450 нм составляла 125 мкмоль/(м²·с). Регистрацию индукционной кривой осуществляли во временном интервале 0–145 с с шагом отбора информации 200 мкс в диапазоне 0–5 с и 0,1 с в диапазоне 5–145 с. Скорость (V) достижения максимального уровня сигнала флуоресценции в быстрой фазе индукционной кривой оценивали по величине наклона этой кривой на участке 0,02–0,14 с. Линейная аппроксимация этого участка была осуществлена с коэффициентом корреляции $R^2 = 0,98$ для вариантов прогрева в течение 20, 40 и 80 мин и 0,88, 0,58 — для прогрева в течение 10 и 5 мин соответственно.

В индукционной кривой контрольного образца (рис. 1, *a*) видны обычные области флуоресцентных переходов. Это области F_0 , F_{pl} и F_m , которые соответствуют интенсивности начального уровня флуоресценции, области так называемого плато и максимальному уровню соответственно. Эти переходы обусловлены процессами, которые происходят в фотосинтетическом аппарате при переходе от состояния темновой адаптации к функциональному состоянию при определенном уровне освещенности. Переход F_0 – F_{pl} определен возрастанием сигнала флуоресценции от уровня начальной интенсивности (F_0) до уровня F_{pl} , обусловленного накоплением электронов на акцепторе Q_A во фракции реакционных центров, в которых не осуществляется перенос на акцептор Q_B и далее к ФСІ. Это так называемые Q_B -невосстанавливающие центры. Дальнейший подъем до уровня F_m связан с накоплением восстановленного акцептора Q_A во фракции Q_B -восстанавливающих центров. Параметр индукционной кривой F_v/F_m , где F_v — переменная флуоресценция $F_v = F_m - F_0$, характеризует эффективность фотохимической реакции ФСІІ. F_{pl}/F_m — отношение интенсивности флуоресценции на плато к максимальной является оценкой доли фракции Q_B -невосстанавливающих центров. Скорость (V) нарастания сигнала флуоресценции от уровня F_{pl} до F_m , т. е. скорость достижения состояния максимального накопления восстановленного акцептора Q_A в Q_B -восстанавливающих центрах ФСІІ, пропорциональна размеру эффективной светособирающей антенны, которая поставляет энергию на реакционные центры. Эффективный размер определяется как произведение концентрации антенных комплексов на эффективность переноса энергии внутри этих комплексов и к реакционным центрам ФСІІ. В свою очередь, V зависит от скорости протока электронов через реакционные центры, т. е. эффективности их оттока к акцептору и восстановления центров донорами. Чем больше появляется в единицу времени центров, способных окисляться, тем более замедляется скорость нарастания сигнала флуоресценции до максимального уровня F_m при насыщающем значении актиничного света.

На рис. 1 показаны графики быстрой фазы индукционных кривых листьев растений, прогретых в течение различных по длительности промежутков времени. Видны немонотонные изменения во времени переменной флуоресценции, а также изменения скорости нарастания сигнала от области плато до максимума. Количественные показатели исследуемых параметров приведены в табл. 1.

Из полученных данных (см. рис. 1, табл. 1) следует, что после 5 мин прогрева фотохимическая активность падает практически до нуля, затем начинает восстанавливаться и после 20 мин прогрева достигает контрольного уровня, после чего опять начинает снижаться. При этом аналогичным образом изменяется скорость нарастания сигнала до уров-

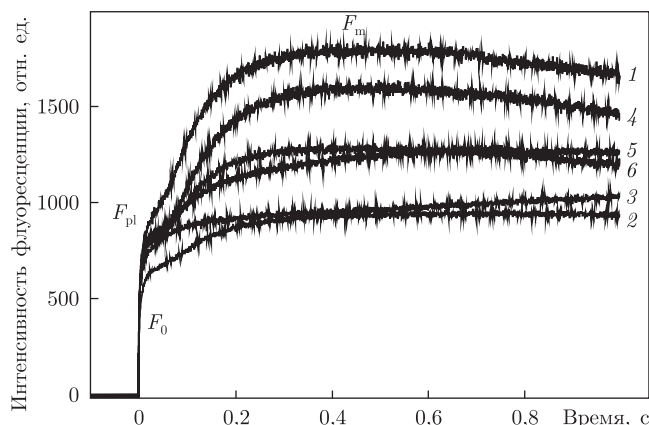


Рис. 1. Кривые индукции флуоресценции хлорофилла (быстрая фаза) в листьях контрольных растений гороха (1) и прогретых при 45 °С в течение 5 (2), 10 (3), 20 (4), 40 (5) и 80 (6) мин

ня F_m . Как указывалось выше, последняя пропорциональна скорости поступления фотонов к реакционным центрам ФСII и обратно пропорциональна скорости электронного транспорта через ФСII. На основании данных табл. 1 можно предположить, что наблюдаемые изменения скорости нарастания флуоресценции, вызываемые прогревом, связаны в основном с изменениями состояния антенны ФСII, вызывающими замедление переноса или потери энергии в антенном комплексе. Действительно, из табл. 1 видно, что прогрев в течение 5 и 10 мин вызывает резкое увеличение доли Q_B -невосстанавливающихся реакционных центров ФСII и, в меньшей мере, после 40- и 80-минутного прогрева. Это означает, что суммарный электронный поток в линейном транспорте уменьшается, что может способствовать только ускорению накопления восстановленного акцептора Q_A и, соответственно, увеличению скорости V .

Обнаруженный эффект замедления V , связанный с изменениями состояния антенного комплекса, согласуется с полученными нами ранее данными относительно разрыхления этого комплекса, которое наблюдали после 5-минутного прогрева хлоропластов гороха при 45 °С [6]. Из табл. 1 также следует, что значительное ингибирование фотохимической активности и разориентация антенного комплекса ФСII, вызываемые 5-минутным прогревом, компенсируются при продолжении прогрева до 20 мин почти полностью для фотохимической активности и на 85% для антенны. При дальнейшем прогреве эти нарушения появляются снова, однако степень поражения меньше и скорость нарастания ниже.

Таблица 1. Изменения параметров индукционной кривой флуоресценции, вызываемые высокотемпературным прогревом

Вариант	F_v/F_m	F_{pl}/F_m	Наклон ($\text{tg } \alpha$)
Контроль	$0,72 \pm 0,02$	$0,61 \pm 0,04$	$6,8 \pm 0,8$
Прогрев			
5 мин	$0,17 \pm 0,01$	$0,89 \pm 0,04$	$0,4 \pm 0,1$
10 мин	$0,60 \pm 0,04$	$0,83 \pm 0,07$	$2,8 \pm 0,5$
20 мин	$0,70 \pm 0,03$	$0,59 \pm 0,05$	$5,0 \pm 0,6$
40 мин	$0,63 \pm 0,03$	$0,67 \pm 0,03$	$3,9 \pm 0,4$
80 мин	$0,57 \pm 0,05$	$0,75 \pm 0,07$	$4,1 \pm 1,0$

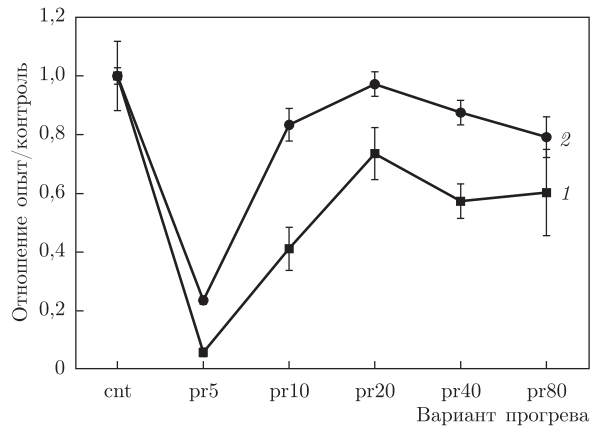


Рис. 2. Относительные изменения размера эффективной антенны ФСII (1) и фотохимической активности (параметр F_v/F_m) (2) в зависимости от продолжительности прогрева

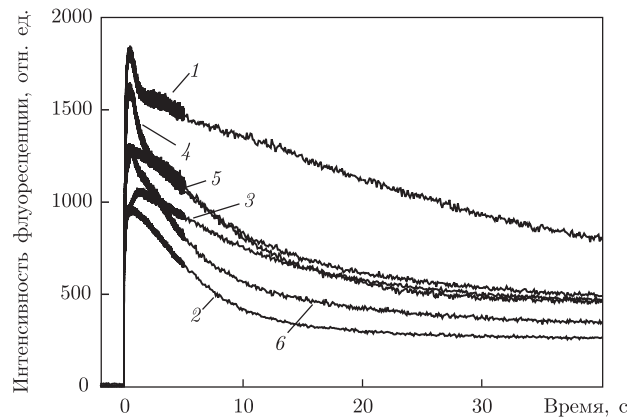


Рис. 3. Индукционные кривые флуоресценции хлорофилла (медленная фаза) в листьях контрольных растений гороха (1) и прогретых при 45 °С в течение 5 (2), 10 (3), 20 (4), 40 (5) и 80 (6) мин

На рис. 2 показана динамика скорости (V) и параметра F_v/F_m при различном времени прогрева. Видно, что оба параметра резко снижаются после 5-минутного прогрева. Увеличение экспозиции до 10 мин приводит к быстрому возрастанию F_v/F_m и небольшому повышению V . Продолжение прогрева вызывает резкое возрастание V после 20 мин и последующее медленное падение при дальнейшем прогреве. Анализ приведенных на рис. 2 данных позволяет заключить, что характер динамики состояния антенного комплекса и комплекса реакционных центров ФСII в процессе начальных стадий адаптации различается.

Следует отметить, что в медленной фазе (участок 0,19–143 с) восстановление формы индукционной кривой практически отсутствует (рис. 3). Даже 20-минутный прогрев не вызывает заметного приближения индукционной кривой к контрольному варианту. Эта область индукционной кривой формируется с участием ряда процессов, сопряженных с электронным транспортом. К их числу относятся, например, протонный транспорт, энергизация мембран, сопряжение с темновыми реакциями. Отсутствие восстановления индукционной кривой в этой области может указывать на необратимость изменений соответствующих процессов. Вместе с тем, возможно, что этот их новый статус создает условия для дальнейшей перестройки метаболизма в адаптационном процессе.

1. Шаркова В. Е., Буболо Л. С. Влияние теплового стресса на структуру тилакоидной системы хлоропластов в клетках зрелых листьев пшеницы // Физиология растений. – 1996. – **43**, № 3. – С. 409–417.
2. Weis E. Short term acclimation of spinach to high temperatures // Plant Physiol. – 1984. – **74**. – P. 402–407.
3. Navaux M., Greppin H., Strasser R. Functioning of photosystems I and II in pea leaves exposed to heat stress // Planta. – 1991. – **186**. – P. 1–15.
4. Mathur S., Allakhverdiev S. I., Jajoo A. Analysis of high temperature stress on the dynamics of antenna size and reducing side heterogeneity of Photosystem II in wheat leaves (*Triticum aestivum*) // Biochim. et Biophys. Acta. – 2011. – **1807**. – P. 22–29.
5. Кислюк И. М., Буболо Л. С., Васюковский М. Д. Увеличение длины и количества мембран тилакоидов в хлоропластах листьев пшеницы в результате теплового шока // Физиология растений. – 1997. – **44**, № 1. – С. 39–44.
6. Kochubey S. M. Changes in antenna of photosystem II induced by short-term heating // Photosynth Res. – 2010. – **106**. – P. 239–246.
7. Кочубей С. М., Шевченко В. В., Казанцев Т. А. Изменения антенны фотосистемы I, индуцируемые кратковременным прогревом // Биол. мембраны. – 2013. – **30**, № 1. – С. 69–80.
8. Шевченко В. В. Свет низкой интенсивности защищает фотосистему 2 от ингибирования при кратковременном прогреве // Физиология и биохимия культ. растений. – 2011. – **43**, № 6. – С. 527–532.
9. Кочубей С. М., Шевченко В. В., Бондаренко О. Ю., Казанцев Т. А. Изменение кинетики окисления и темнового восстановления реакционных центров фотосистемы I, индуцированные кратковременным прогревом // Там же. – 2009. – **41**, № 1. – С. 36–43.

Институт физиологии растений
и генетики НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 03.11.2012

С. М. Кочубей, В. В. Шевченко, О. Ю. Бондаренко, І. Д. Панас

Динаміка змін функціональної активності фотосинтетичного апарату рослин гороху, які викликаються високотемпературним стресом

Показано, що 5-хвилинний прогрів рослин гороху при 45 °C викликає падіння фотохімічної активності майже до нульового рівня. Істотно зменшується швидкість накопичення відновлених акцепторів електронів у реакційних центрах фотосистеми II. Пролонгація прогріву до 20 хв обумовлює повернення цих параметрів майже до рівня контролю. Одержані дані виявляють новий ефект у початковій стадії адаптації рослини до високотемпературного стресу.

S. M. Kochubey, V. V. Shevchenko, O. Yu. Bondarenko, I. D. Panas

Dynamics of changes in the functional activity of the photosynthetic apparatus of pea plants caused by high-temperature stress

The warming up of pea plants at 45 °C for 5 min evokes a decrease in the photochemical activity almost to zero level. The rate of accumulation of the reduced acceptors in reaction centers of Photosystem II also essentially decreases. Prolongation of heating to 20 min results in the recovery of these parameters almost to control level. The obtained data reveal a new effect in the initial stage of adaptation of a plant to high-temperature stress.