

УДК 581.1

СПЕКТРАЛЬНИЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ТЕРМОУСТОЙЧИВОСТІ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА РАСТЕНИЙ

В. В. ШЕВЧЕНКО, О. Ю. БОНДАРЕНКО

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
 Украина, 03022, г. Киев, ул. Васильковская, 31/17,
 e-mail: biochemkiev@ukr.net

Цель. Целью данной работы является оценка возможностей применения спектрального параметра — отношения значений поглощения при длинах волны 680 и 850 нм ($k = A_{680}/A_{850}$) для тестирования термоустойчивости растений по изменению размеров хлоропластов при кратковременном прогреве. **Методы.** Проведен кратковременный (5 мин) прогрев в диапазоне 25–45 °С хлоропластов, выделенных из двухнедельных растений гороха, кукурузы и 4-х сортов озимой пшеницы, отличающихся по термоустойчивости. По спектрам поглощения хлоропластов рассчитаны изменения параметра k . **Результаты.** Все прогретые хлоропласты показали изменения спектрального параметра k . Особенно сильные и стабильные изменения обнаружены при прогреве 40–45 °С. По возрастанию степени изменений спектрального параметра растения расположились в порядке: кукуруза, горох, пшеница. **Выводы.** Интенсивность изменений k совпала с предварительной оценкой термоустойчивости для кукурузы и разных сортов озимой пшеницы. Рекомендуется использование спектрального параметра k для быстрого скрининга сортов на термоустойчивость фотосинтетического аппарата в пределах одной культуры.

Ключевые слова: хлоропласты различных видов растений, фотосинтетический аппарат, кратковременный прогрев, оценка термоустойчивости.

Температура окружающей среды является важным фактором, определяющим урожайность сельскохозяйственных культур [1]. Даже повышение средней температуры за сезон вегетации на 1 °С приводит к потере урожайности на 17 % [2]. В условиях глобального потепления климата усилия многих исследователей и селекционеров направлены на выведение сортов культурных растений, устойчивых к повышенным температурам. Значительный интерес также проявляется к разработке методов скрининга устойчивости новых сортов. Однако поиск генетических маркеров затруднен тем, что устойчивость к повышенным температурам является полигенным признаком. Между тем, хорошо известно, что фотосинтетический аппарат растений очень чувствителен к повышенным температурам [3]. Считается, что устойчивость растений к стрессу в значительной мере определяется устойчивостью его фотосинтетического аппарата [4]. Поэтому разработка подходов тестирования устойчивости фотосинтетического аппарата является перспективной.

Так, ранее нами было обнаружено уменьшение размеров хлоропластов гороха при кратковременном прогреве (5 мин) [5]. Показано, что изменения начинаются уже при 25-градусном прогреве и являются обратимыми в диапазоне 25–35 °С, а свыше становятся необратимыми. Изменения размеров полностью совпадают с изменением максимального квантового выхода фотосистемы II (F_v/F_m) [6]. Для хлоропластов кукурузы аналогичные изменения наблюдались со сдвигом на 5 °С в сторону более высоких температур [6]. Как показали электронно-микроскопические исследования, в основе этого явления лежит реорганизация гранальной системы хлоропластов [7].

Поскольку массовое применение микроскопических и электронно-микроскопических исследований является достаточно сложным и дорогостоящим, для быстрого тестирования изменений размеров хлоропластов был предложен спектральный параметр k , который представляет собой отношение значений поглощения на длине волны 680 нм, максимум поглощения хлорофилла, и 850 нм, где хлорофилл не поглощает, а поглощение определяется рассеиванием света, зависящим от размера частиц [6].

© В. В. ШЕВЧЕНКО, О. Ю. БОНДАРЕНКО, 2016

Целью данной работы является оценка возможностей применения спектрального параметра — отношения значений поглощения при длинах волны 680 и 850 нм ($k = A_{680}/A_{850}$) для тестирования термоустойчивости растений по изменению размеров хлоропластов при кратковременном прогреве.

Материалы и методы

Для исследований использовали сельскохозяйственные культуры с различной термоустойчивостью. Горох (*Pisum sativum* L.) — холодлюбивая культура, температурный оптимум выращивания 16–18 °С, кукуруза (*Zea mays* L.) — теплолюбивая (24–26 °С) и пшеница (*Triticum aestivum* L.) (20–24 °С). Представленные сорта озимой пшеницы в сортоиспытании получили различную оценку термо-засухоустойчивости (Перлына Лисостепу — 5–6 баллов, Достаток — 7–8 баллов, Подолянка — 8 баллов и Одесская 267 — 8–9 баллов) [8]. Растения гороха сорта «Венец», кукурузы гибрида «Титан 220» и пшеницы сортов Перлына Лисостепу, Достаток, Подолянка и Одесская 267 выращивали в 3-х кг сосудах, в смеси грунт/песок — 5/1 в естественных условиях.

Для выделения хлоропластов использовали полностью сформированные листья двухнедельных растений. Хлоропласты выделяли, как описано ранее [9], затем ресуспендировали в среде, содержащей 10 мМ трициновый буфер (рН 7.5) 0,4 М сахарозу, 10 мМ NaCl и 5 мМ MgCl₂. Поскольку кукуруза относится к растениям с C₄ типом фотосинтеза и содержит 2 типа хлоропластов, мезофилла и обкладки, для нее выделялись именно хлоропласты мезофилла, которые имеют гранальную систему аналогичную хлоропластам из растений с C₃ типом фотосинтеза.

Контрольный образец сохраняли в темноте при 5 °С. Прогрев хлоропластов проводили в диапазоне 25–45 °С с шагом 5 °С. Для этого суспензию хлоропластов (концентрация хлорофилла 0,01 мг/мл) помещали в плоскодонную колбу так, чтобы образовался тонкий слой. Затем колбу опускали в воду соответствующей температуры и выдерживали в течение 5 мин в темноте. После этого суспензию сразу охлаждали до 5 °С и проводили измерения. Спектры поглощения записывали на спектрофотометре Specord 200, Analytik Jena, Германия, в диапазоне 400–850 нм. Параметр $k = A_{680}/A_{850}$ рассчитывали как отношение значений поглощения на соответствующих длинах волн. Расчеты проводили по данным 5-ти экспериментов при 3-х биологических повторностях.

Результаты и обсуждение

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены типичные изменения спектров поглощения хлоропластов, наблюдаемые при кратковременном прогреве. Для спектров, нормированных в максимуме поглощения хлорофилла (680 нм), наблюдается существенное снижение интенсивности поглощения в спектральной области свыше 750 нм, где хлорофилл уже не поглощает, а интенсивность спектра зависит от уровня рассеивания. Степень изменений увеличивается с ростом температуры прогрева.

Ранее нами была разработана методика сравнительной оценки размеров частиц с применением спектров поглощения при комнатной температуре [5]. Эта методика базируется на специфическом свойстве спектров поглощения рассеивающей среды. Из теории рассеяния света известно, что доля рассеянного света увеличивается с размером частиц [10]. Для суспензий частиц, поглощающих свет, известны специфические явления, которые приводят к искажению спектров поглощения. Это эффект увеличения длины оптического пути, который характерен для высокой концентрации частиц, и, так называемый, «эффект проскока» [11].

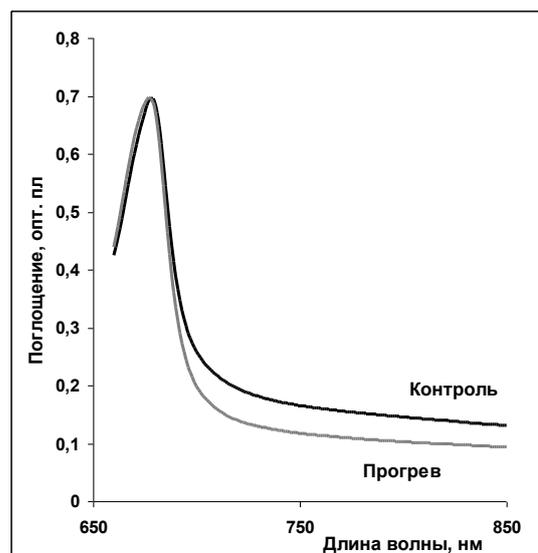


Рис. 1. Изменения спектров поглощения хлоропластов при кратковременном (5 мин) прогреве.

Первый из названных эффектов обусловлен тем, что в густой суспензии световой луч многократно изменяет направление распространения благодаря отражению на границе частичка-среда и потому длина оптического пути значительно увеличивается, что приводит к росту числа частичек на пути луча и увеличивает достоверность его поглощения. В этом случае величина поглощения становится большей, чем это следует из закона Ламберта-Бэра. «Эффект проскока» характерен для суспензий с низкой оптической плотностью. Он обусловлен тем, что определенная часть светового луча может пройти сквозь суспензию и не быть поглощенной благодаря многократным отклонениям отраженного от частичек света и его прохождению между частичками.

Этот эффект приводит к уменьшению величины поглощения света в суспензии по сравнению с тем, что должно было наблюдаться в отсутствии рассеяния света. Величина искажений спектров зависит от рассеивающей способности частиц. В связи с этим очень важным является подбор концентрации хлорофилла, которая связана с количеством хлоропластов. Проведенные исследования показывают, что оптимальной является концентрация 0,01 мг/мл.

Принимая во внимание эти особенности спектров поглощения рассеивающих сред, был разработан подход для оценки размеров частиц по спектрам их поглощения. В качестве параметра для оценки размера частиц были избраны

отношения интенсивностей в спектре поглощения при 680 и 850 нм, $k = A_{680}/A_{850}$, т. е. в максимуме красной полосы поглощения хлорофилла и на значительном отдалении от нее, там, где практически отсутствует поглощение хлорофилла. Проведенное нами ранее [6] сравнение площадей изображения хлоропластов и субхлоропластных фрагментов на микрофотографиях и спектрального параметра показало, что большей площади изображения хлоропласта отвечает меньший показатель k . Этот результат соответствует теории рассеяния света, соответственно которой величина рассеяния пропорциональна объему частиц. Чем крупнее частицы, тем больше величина рассеяния, а значит и выше поглощение при 850 нм, что приводит к уменьшению отношения $k = A_{680}/A_{850}$.

В табл. 1 приведены изменения спектрального параметра k при кратковременном (5 мин) прогреве при разных температурах хлоропластов исследуемых растений. Кратковременный прогрев в большинстве случаев индуцировал увеличение показателя k , что указывало на уменьшение размеров хлоропластов. В диапазоне прогрева 25–35 °С изменения были незначительными, а для хлоропластов из листьев кукурузы практически отсутствовали. Исследуемое явление значительно усиливалось при прогреве в диапазоне 40–45 °С. Изменения показателя k в диапазоне 25–30 °С отличались по значению для разных партий материала, но они всегда были меньше, чем для 40–45 °С.

Таблица 1. Изменения спектрального параметра $k = A_{680}/A_{850}$ при кратковременном (5 мин) прогреве хлоропластов

Температура прогрева	Горох	Кукуруза	Перлына Лисостепу	Достаток	Подольнка	Одесская 267
Контроль	5,56 ± 0,06	5,03 ± 0,05	5,20 ± 0,04	5,17 ± 0,03	5,28 ± 0,04	5,15 ± 0,04
25 °С	5,67 ± 0,08	5,05 ± 0,07	5,76 ± 0,14	5,41 ± 0,15	5,48 ± 0,14	5,53 ± 0,13
30 °С	5,82 ± 0,08	5,06 ± 0,05	6,06 ± 0,15	5,42 ± 0,15	5,65 ± 0,12	5,71 ± 0,10
35 °С	5,83 ± 0,30	5,01 ± 0,10	6,60 ± 0,29	5,75 ± 0,25	6,12 ± 0,26	5,89 ± 0,28
40 °С	6,48 ± 0,13	5,38 ± 0,11	6,74 ± 0,10	6,25 ± 0,13	6,26 ± 0,13	6,08 ± 0,13
45 °С	6,72 ± 0,13	5,67 ± 0,12	6,96 ± 0,13	6,60 ± 0,13	6,70 ± 0,13	6,46 ± 0,13

Как было показано ранее, точка 35 °С является переходной между обратимыми и необратимыми изменениями. Она наиболее нестабильна, и полученные при этой температуре значения сильно варьировали от опыта к опыту.

Размеры хлоропластов в контрольном варианте отличались для исследуемых растений.

Хлоропласты гороха были самыми мелкими, у кукурузы — самыми крупными, а у разных сортов озимой пшеницы были достаточно близки между собой и занимали промежуточное значение между горохом и кукурузой. Для сравнения степени изменений при прогреве был рассчитан процент изменения спектрального параметра

$k = A_{680}/A_{850}$, который показывает, насколько сильно сжимаются хлоропласты (рис. 2).

Наименьшие изменения происходили с хлоропластами кукурузы. В нижнем диапазоне прогревов, 25–30 °С, сжатия хлоропластов практически не наблюдалось, а при прогреве 45 °С уменьшение составляло не более 13 %. Хлоропласты из растений гороха, показали следующие изменения. В нижнем диапазоне было несколько большим, чем у хлоропластов из листьев кукурузы, и составляло около 5 %, а в верхнем диапазоне прогревов значительно усиливалось и достигало 21 %. Максимальные изменения спектрального параметра наблюдали для хлоропластов, выделенных из листьев разных сортов пшеницы. В нижнем диапазоне они составили 4–15 % и достаточно сильно варьировали для разных партий материала. При прогреве 40–45 °С происходили достаточно сильные изменения. Для сорта Перлына Лисостепу они были максимальными и составили почти 37 %, минимальные изменения показал сорт Одесская 267–25 %, а сорта Достаток и Подольянка показали промежуточные значения. Как уже отмечалось выше, температура прогрева 35 °С является переходной между обратимыми и необратимыми изменениями в выделенных хлоропластах [5]. В этой точке прогрева процент изменений может сильно варьировать.

Следует отметить, что спектральный параметр $k = A_{680}/A_{850}$ лишь тестирует изменения, но его изменения по абсолютным значениям не совпадают с изменениями объема хлоропластов. Как показано нами ранее [5], при кратковременном прогреве хлоропласты не только

уменьшаются в объеме, а и изменяют свою форму. У них изменяется соотношение длинной и короткой осей таким образом, что они становятся более округлыми. Аналогичные изменения наблюдались нами и при прогреве целых листьев, которые сразу же фиксировались для электронной микроскопии. Кроме того, было показано, что при прогреве в нативных хлоропластах наблюдается реорганизация всей тилакоидной системы. При низких температурах граны хлоропластов начинают сближаться друг с другом, а при более высоких происходит слияние гран с формированием меньшего числа гран, которые содержат большее число тилакоидов. Кроме того наблюдается частичная расстыковка краевых участков гран [7, 12, 13]. Все эти процессы могут дополнительно влиять на изменение рассеивающих свойств суспензии хлоропластов.

Из диаграммы (рис. 2), видно как, по степени изменений спектрального показателя k при прогреве, расположились исследуемые культуры. В ее центральной части можно наблюдать пересечение отдельных кривых, что связано с большим варьированием точки — 35 °С в разных сериях экспериментов.

Тем не менее, участок 40–45 °С всегда оставался стабильным, и даже, не смотря на небольшую разницу между 3-мя сортами озимой пшеницы, представленные культуры и сорта в каждой серии экспериментов всегда располагались в одинаковом порядке. Нижнее положение, с минимальными изменениями стабильно занимала кукуруза, что соответствует представлению о том, что это самая теплолюбивая культура.

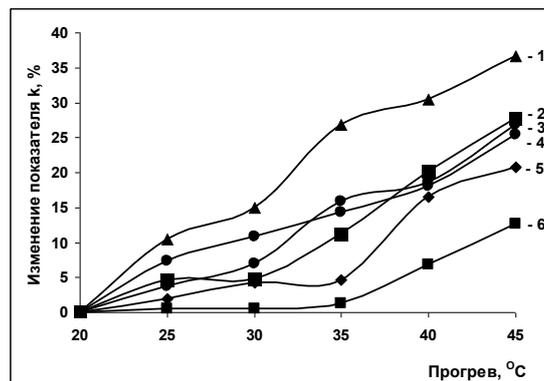


Рис. 2. Изменение спектрального показателя k , при прогреве хлоропластов из различных культур, где: 1 — пшеница, сорт Перлына Лисостепу; 2 — пшеница, сорт Достаток; 3 — пшеница, сорт Подольянка; 4 — пшеница, сорт Одесская 267; 5 — горох; 6 — кукуруза.

Самое верхнее положение (наибольшие изменения) занял сорт Перлына Лисостепу, который и при сортоиспытании показал наименьшую тепло-засухоустойчивость (5–6 баллов). Довольно близкое положение заняли сорта Достаток, Подолянка и Одесская 267. При этом все исследуемые сорта озимой пшеницы всегда располагались по степени изменений, от больших изменений к меньшим, в следующем порядке Перлына Лисостепу → Достаток → Подолянка → Одесская 267. Что показывает совпадение с результатами оценки термо-засухоустойчивости, поставленной при сортоиспытании (Перлына Лисостепу — 5–6 баллов, Достаток — 7–8 баллов, Подолянка — 8 баллов и Одесская 267 — 8–9 баллов).

Тем не менее, горох, который из исследуемых культур является самой холодолюбивой, не показал наибольших структурных изменений по показателю k . На диаграмме он занял положение между кукурузой и пшеницей. Вероятно, это связано с тем, что кукуруза и пшеница относятся к семейству злаковых, а горох к семейству бобовых, каждое из которых может отличаться возможной степенью структурных изменений.

Несмотря на то, что структурные изменения, которые тестируются по показателю k , близко совпадают с угнетением функциональной активности [6], известен целый ряд молекулярных механизмов повреждающего действия повышенной температуры на фотосинтетический аппарат [4]. К ним относится формирование активных форм кислорода, нарушение электронного транспорта, фотоингибирование, изменение эффективных размеров фотосинтетических антенн, падение активации ключевого фермента темновой фазы фотосинтеза РБФК/О, перекисное окисление липидов и др. Так же, имеется целый набор молекулярных механизмов устойчивости фотосинтетического аппарата к температурному стрессу [4]. Эффективность работы именно этих механизмов может определять отличия в термоустойчивости фотосинтетического аппарата различных семейств и видов растений. Кроме того, не следует забывать, что имеется целый ряд других механизмов, определяющих устойчивость растений к стрессу, и только на 70–80 % она определяется устойчивостью фотосинтетического аппарата [4].

Проведенные исследования установили, что предложенный для оценки термоустойчивости фотосинтетического аппарата различных

культур спектральный параметр $k = A_{680}/A_{850}$, рассчитываемый из спектров поглощения хлоропластов, показал достаточно хорошее совпадение с результатами сортоиспытаний только в рамках сортов одной культуры и может быть использован лишь как дополнительный параметр. Поэтому, он не подходит для сравнения между собой термоустойчивости различных групп растений или культур.

Выводы

Интенсивность изменений k совпала с предварительной оценкой термоустойчивости для кукурузы и разных сортов озимой пшеницы. Рекомендуется использование спектрального параметра k для быстрого скрининга сортов на термоустойчивость фотосинтетического аппарата в пределах одной культуры.

Список литературы

1. Моргун В. В., Швартау В. В., Киризий Д. А. Физиологические основы формирования высокой продуктивности зерновых злаков // Физиология и биохимия культ. растений. — 2010. — 42, № 5. — с. 371–392.
2. Lobel D. V., Asner G. P. Climate and management contributions to recent trends in U. S. agricultural yields // Science. — 2003. — 299. — P. 1032.
3. Berry J., Björkman O. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants // Ann. Rev. Plant. Physiol. — 1980. — V. 31. — P. 491–543.
4. Креславский В. Д., Карпентьер Р., Климов В. В. и др. Молекулярные механизмы устойчивости фотосинтетического аппарата к стрессу // Биологические мембраны. — 2007. — № 3. — С. 195–217.
5. Кочубей С. М., Шевченко В. В., Бондаренко О. Ю. Влияние кратковременного прогрева на изменения размеров хлоропластов гороха // Физиология и биохимия культ. растений. — 2008. — Т. 40, № 2. — С. 126–132.
6. Кочубей С. М., Шевченко В. В., Бондаренко О. Ю. Динамические свойства структурных единиц хлоропластов. — К.: Логос, 2010. — 176 с.
7. Бондаренко О. Ю., Шевченко В. В. Изменения структуры хлоропластов листьев гороха, индуцированные кратковременным прогревом // Физиология и биохимия культ. растений. — 2012. — Т. 44, № 3, — С. 265–269.
8. Моргун В. В., Санін Є. В., Швартау В. В. Клуб 100 центнерів. Сучасні сорти та системи живлення і захисту озимої пшениці. — К.: Логос, 2014. — 152 с.
9. Кочубей С. М., Воловик О. И., Корнеев Д. Ю., Порублева Л. В., Шевченко В. В. Организация и функциональная активность фрагментов межгранальных и гранальных тилакоидов гороха // Физиология растений. — 1998. — Т. 45, № 6. — С. 805–812.
10. Bryant F. D., Latimer P., Seiber B. A. Changes in total light scattering and absorption caused by changes in partial conformation — A test of theory // Arch. Biochem. Biophys. — 1969. — Т. 135, № 2. — P. 109–117.
11. Хлюст Г. Рассеяние света малыми частицами. — Москва: Мир, 1961. — 358 с.

12. Бондаренко О. Ю. Изменение размеров хлоропластов листьев гороха, индуцированное кратковременным прогревом // Физиология и биохимия культурных растений. — 2010. — 42. — С. 79–83.
13. Бондаренко О. Ю. Изменения состояния фотосинтетических мембран хлоропластов гороха при кратковременном прогреве // Физиология и биохимия культурных растений. — 2016. — 48, № 1. — С. 34–42.

Представлена Стасіком О. О.
Надійшла 16.06.2016

SPECTRAL METHOD OF EVALUATION OF PHOTOSYNTHETIC APPARATUS THERMAL RESISTANCE

V. V. Shevchenko, O. Yu. Bondarenko

Institute of Plant Physiology and Genetics,
National Academy of Sciences of Ukraine,
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine
e-mail: biochemkiev@ukr.net

Aim. The aim of this work is to evaluate the possibilities of application of the spectral parameter — the relationship of the absorption values at 680 and 850 nm ($k = A_{680}/A_{850}$) for testing heat resistance of plants to change the size of chloroplasts at short-term heating. **Methods.** The short-term (5 minutes) heating in the range 25–45 °C was carried out for chloroplasts isolated from two-week-old pea, corn and 4 winter wheat varieties differing in heat resistance. From the absorption spectra of chloroplasts was calculated changes of parameter k . **Results.** All heated chloroplasts showed changes in the spectral parameter k . Particularly strong and stable changes observed during heating at 40–45 °C. In terms of changes in the spectral parameter plants are ranged in the following order — corn, pea, wheat. **Conclusions.** The intensity of the k changes coincided with the preliminary estimation of thermal stability for corn and different varieties of winter wheat. It is recommended to use the spectral parameter k for the

rapid screening of varieties on the thermal stability of the photosynthetic apparatus within the same species.

Keywords: chloroplasts of different species of plants, the photosynthetic apparatus, short-term heating, evaluation of the thermal stability.

СПЕКТРАЛЬНИЙ МЕТОД ОЦІНКИ ТЕРМОСТІЙКОСТІ ФОТОСИНТЕТИЧНОГО АПАРАТУ РОСЛИН

В. В. Шевченко, О. Ю. Бондаренко

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17,
e-mail: biochemkiev@ukr.net

Мета. Метою даної роботи є оцінка можливостей застосування спектрального параметра — відношення значень поглинання на довжинах хвиль 680 та 850 нм ($k = A_{680}/A_{850}$) для тестування термостійкості рослин за зміною розмірів хлоропластів за дії короткочасного прогріву. **Методи.** Проведено короткочасний (5 хв) прогрів у діапазоні 25–45 °C хлоропластів, виділених із двотижневих рослин гороху, кукурудзи та 4-ох сортів озимої пшениці, які відрізняються за термостійкістю. За спектрами поглинання хлоропластів розраховані зміни параметру k . **Результати.** Всі прогріті хлоропласти показали зміни спектрального параметру k . Найбільш значні та стабільні зміни виявлені при прогріві 40–45 °C. За ступенем змін спектрального параметру рослини розташувались в наступному порядку — кукурудза, горох, пшениця. **Висновки.** Інтенсивність зміни k співпала з попередньою оцінкою термостійкості для кукурудзи та різних сортів озимої пшениці. Рекомендується використання спектрального параметра k для швидкого скрінінгу сортів на термостійкість фотосинтетичного апарату в межах однієї культури.

Ключові слова: хлоропласти різних видів рослин, фотосинтетичний апарат, короткочасний прогрів, оцінка термостійкості.