

УДК 581.132

СВЕТ НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ ЗАЩИЩАЕТ ФОТОСИСТЕМУ II ОТ ИНГИБИРОВАНИЯ ПРИ КРАТКОВРЕМЕННОМ ПРОГРЕВЕ

В.В. ШЕВЧЕНКО

*Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины
03022 Киев, ул. Васильковская, 31/17*

Методом индукции флуоресценции хлорофилла исследовано влияние кратковременного прогрева листьев гороха, выращенного при максимальной дневной температуре 18 °С, в темноте и при освещении различной интенсивности на изменение активности ФС II и работу электронтранспортной цепи. Прогрев при 25 °С в темноте вызывал замедление нарастания сигнала в быстрой фазе, но почти не изменял F_v/F_m , а при 45 °С — приводил к практически полному исчезновению вариабельной флуоресценции. Прогрев при 25 °С при интенсивности света 5—10 клк способствовал сохранению времени достижения максимального уровня флуоресценции, при 45 °С — сохранению активности ФС II на уровне 80—82 % контроля. Действие света более высокой интенсивности усиливало ингибирование активности ФС II. Таким образом, показано, что свет низкой интенсивности при кратковременном прогреве оказывает защитный эффект на активность ФС II.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., индукция флуоресценции хлорофилла, активность ФС II, кратковременный прогрев, защитный эффект света низкой интенсивности.

Фотосинтетический аппарат растений чрезвычайно чувствителен к изменениям условий окружающей среды, особенно к действию высоких температур [13]. В наших работах [1, 3] показано, что кратковременный прогрев вызывает сжатие хлоропластов, степень которого зависит от интенсивности прогрева. Кроме структурных изменений снижается функциональная активность хлоропластов. Одним из наиболее чувствительных сайтов фотосинтетического аппарата к действию высоких температур считается комплекс фотосистемы II [4, 15]. Так, 5-минутный прогрев при 25 °С вызывает замедление быстрой фазы индукционной кривой, которое может быть связано с нарушением эффективности переноса энергии между светособирающим комплексом и реакционным центром ФС II. Прогрев при более высоких температурах приводит к полному ингибированию функциональной активности ФС II [11].

Существует ряд противоречивых данных о совместном действии света и повышенной температуры на фотосинтетический аппарат. Так, на хлоропластах, инкубированных при повышенных температурах, доказано, что свет оказывает защитный эффект на электронтранспортную цепь [5] или приводит к селективному выцветанию фотосинтетических пигментов [7]. Защитное действие света во время температурного стресса показано также на листьях ячменя [9] и гороха [8]. В то же время имеются сообщения о том, что свет усиливает ингибирование фотосинтети-

ческой активности во время температурного стресса в листьях или хлоропластах [10, 12, 14].

В наших работах [2] установлено, что свет низкой интенсивности оказывает защитный эффект на степень сжатия хлоропластов при температурном стрессе.

Целью данной работы является изучение эффекта совместного действия температурного стресса и света различной интенсивности на функциональную активность ФС II.

Методика

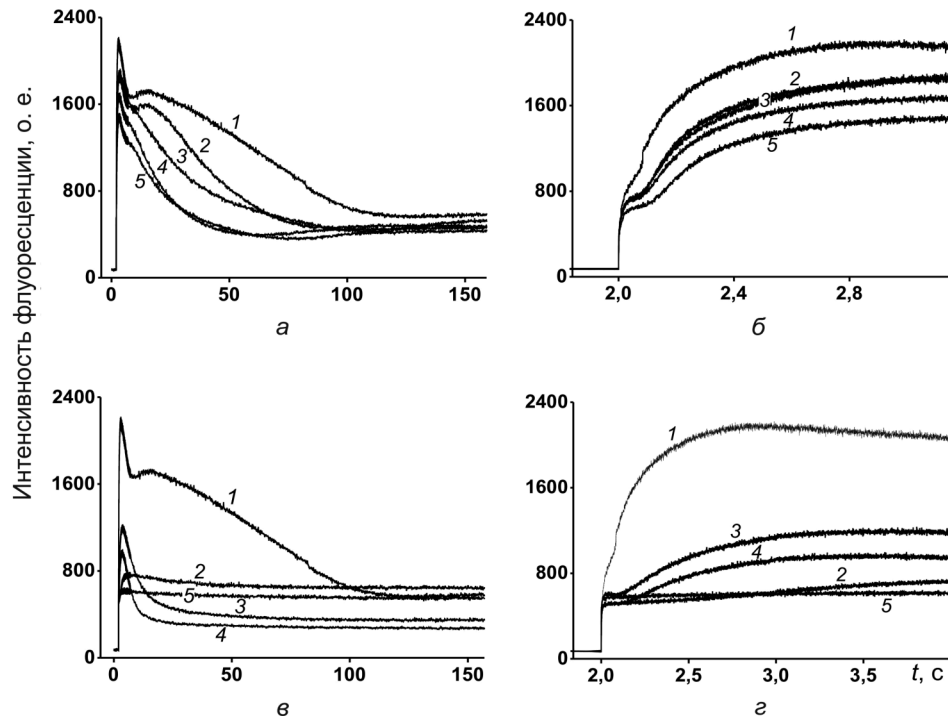
Растения гороха (*Pisum sativum* L.) выращивали в вегетационном домике при естественных условиях. Средняя максимальная дневная температура и освещенность за период выращивания составляли 18 °С и 20 клк.

Исследовали полностью сформированные листья второго яруса 14-суточных растений. Перед измерениями растения выдерживали в течение 30 мин в темноте при температуре 18 °С, после чего от них отделяли листья. Для проведения тепловой обработки их укладывали в прозрачный тонкостенный плоскодонный стакан, сверху помещали такой же стакан меньшего диаметра, затем их опускали в водяной термостат, в верхний стакан добавляли воду соответствующей температуры для более равномерного прогрева. Прогрев осуществлялся в течение 5 мин при температуре 25 и 45 °С в темноте или при освещении белым светом. Контрольные листья также помещали в стакан, но выдерживали их 5 мин в темноте при температуре воды 18 °С. Для освещения использовали лампу накаливания «OSRAM-200», интенсивность освещения регулировали от 3 до 45 клк. Во время прогрева с освещением образцы отделяли от лампы накаливания водяным фильтром толщиной 5 см для устранения дополнительного их нагрева инфракрасным светом. И контрольные, и обработанные листья перед измерениями в течение 20 мин повторно выдерживали в темноте при температуре 18 °С.

Индукцию флуоресценции записывали на однолучевой установке, собранной в лаборатории, при температуре 18 °С. В качестве источника актиничного света использовали светодиод «Royal Blue» с длиной волны излучения 450 нм, дополнительно оснащенный светофильтром СЗС-3. Флуоресценцию измеряли на длине волны 685 нм, которую выделяли с помощью монохроматора МДР-2, спектральная ширина интервала — 4 нм. Интенсивность актиничного света — 20 Вт/м². Перед входной щелью монохроматора размещали светофильтр КС-14. Регистрация осуществлялась ФЭУ-79, сигнал с него преобразовывался с помощью сконструированного нами приемного блока, который вмещал АЦП-ЦАП и интерфейс для сопряжения с компьютером типа IBM. Шаг отбора информации составлял 200 мкс. Определяли следующие параметры индукции флуоресценции хлорофилла: F_0 — уровень флуоресценции, излучаемой комплексами ФС II с «открытыми» реакционными центрами; F_v/F_m — потенциальный квантовый выход ФС II и время достижения F_m . Усреднение проводили для четырех опытов при трех биологических повторностях.

Результаты и обсуждение

На рисунке представлены кривые индукции флуоресценции листьев гороха, контрольных и прогретых в течение 5 мин при температуре 25 и 45 °С. В медленной фазе индукционной кривой флуоресценции прогрев



Медленная (а, в) и быстрая (б, г) фазы кривых индукции флуоресценции листьев гороха, прогретых при 25 °С (а, б) и при 45 °С (в, г) в темноте и при разной интенсивности света: 1 — контроль; 2 — прогрев в темноте; 3 — прогрев + свет 5 клк; 4 — прогрев + свет 10 клк; 5 — прогрев + свет 20 клк

в темноте при 25 °С вызывал снижение интенсивности пика M1, более быстрый выход на уровень стационарной флуоресценции и снижение уровня последней. В быстрой фазе индукционной кривой наблюдалось незначительное снижение максимального уровня флуоресценции. Уровень F_0 практически не изменялся, в каждом эксперименте скорость нарастания интенсивности флуоресценции уменьшалась, а время достижения ее максимального уровня соответственно увеличивалось (таблица).

Прогрев в темноте при 45 °С приводил к значительному снижению уровня варибельной флуоресценции, исчезновению пика M1 и практически полному отсутствию снижения интенсивности флуоресценции после достижения максимума до стационарного уровня. В быстрой фазе уровень F_0 несколько повышался, что свидетельствовало об увеличении количества «открытых» или поврежденных центров. Также оставалась небольшая, очень медленная варибельная флуоресценция. Это означает, что происходит довольно значительное повреждение реакционных центров ФС II.

В дальнейшем одновременно с прогревом мы использовали свет разной интенсивности для оценки их совместного влияния на работу ФС II и электронтранспортной цепи хлоропластов. На рисунке, а приведены кривые индукции флуоресценции для листьев, прогретых при 25 °С в темноте и при разной интенсивности освещения.

Установлено, что при одновременном действии освещения и 25-градусного прогрева максимальный уровень флуоресценции снижался. Степень его снижения увеличивалась с повышением интенсивности освещения. При этом постепенно исчезал пик M1, сокращалось время

Изменение параметров индукционной кривой для листьев гороха при прогреве в темноте и при разной интенсивности света

Вариант	F_v/F_m	Время достижения максимального уровня t_{\max} , с
Контроль	0,83±0,01	1,30±0,1
Прогрев 25 °С	0,82±0,01	1,5±0,1
Прогрев 45 °С	0,30±0,05	4,7±1,0
Прогрев 25 °С + освещение 5 клк	0,82±0,02	1,2±0,03
Прогрев 25 °С + освещение 10 клк	0,80±0,02	1,1±0,02
Прогрев 25 °С + освещение 20 клк	0,78±0,03	1,45±0,02
Прогрев 25 °С + освещение 30 клк	0,72±0,03	1,5±0,03
Прогрев 25 °С + освещение 45 клк	0,63±0,02	1,5±0,03
Прогрев 45 °С + освещение 5 клк	0,68±0,02	1,6±0,02
Прогрев 45 °С + освещение 10 клк	0,68±0,03	1,5±0,02
Прогрев 45 °С + освещение 20 клк	0,45±0,02	1,6±0,03
Прогрев 45 °С + освещение 30 клк	0,20±0,02	3,3±0,5
Прогрев 45 °С + освещение 45 клк	0,18±0,03	4,1±0,3

достижения стационарного уровня. Такие изменения формы медленной фазы индукции флуоресценции связаны с тем, что она зависит от светоиндуцированного формирования трансмембранного градиента H^+ , а также с активацией биохимических реакций и энергозависимых ферментов, активность которых определяет уровень использования АТФ и НАДФН. Во время прогрева хлоропластов при действии освещения предварительно формируется трансмембранный градиент протонов и активируются ферменты, степень этих процессов возрастает с повышением интенсивности освещения в пределах 5—20 клк. При действии освещения большей интенсивности наблюдалось фотоингибирование активности ФС II.

На рисунке, *б* представлены кривые индукции быстрой фазы флуоресценции для прогретых при 25 °С в темноте и при освещении листьев растений гороха. В результате прогрева уровень F_o практически не изменялся, уровень F_v/F_m постепенно снижался с повышением интенсивности освещения. Время достижения максимального уровня увеличивалось при прогреве в темноте, возвращалось к контрольному при прогреве под действием освещения интенсивностью 5—10 клк и снова увеличивалось при действии освещения 20 клк и больше.

На рисунке, *в*, *г* представлены кривые индукции флуоресценции для листьев гороха, прогретых при 45 °С в темноте и при разной интенсивности освещения. Повреждающий прогрев при 45 °С в темноте приводил почти к полной потере варибельной флуоресценции (отношение F_v/F_m снижалось от 0,83 в контроле до 0,30 после прогрева (см. таблицу), а также к исчезновению пика М1 и практически полному исчезновению медленной фазы флуоресценции на индукционной кривой. Действие освещения низкой интенсивности (5—10 клк) приводило к частичному восстановлению работы электронтранспортной цепи. Отношение F_v/F_m возрастало до 0,68. После достижения максимума уровень флуоресценции снижался снова, что было связано с восстановлением взаимодействия световой и темновой фаз работы фотосинтетического аппарата, однако пик М1 не появлялся, как и при 25-градусном прогреве. Действие освещения боль-

ших интенсивностей приводило к дальнейшей потере активности (см. таблицу).

Полученные результаты можно объяснить тем, что прогрев при 25 °С не приводит к значительному повреждению фотосинтетического аппарата, а в условиях освещения, наоборот, ускоряет биохимические ферментативные реакции. Это способствует более активному использованию энергетических эквивалентов, получаемых при первичной фазе фотосинтеза, что, в свою очередь, обуславливает более быстрое достижение стационарного уровня. При одновременном действии освещения и прогрева, по-видимому, формируется трансмембранный протонный градиент, как уже предполагалось в работе [10].

Наиболее интересные результаты получены при действии освещения разной интенсивности и прогрева при 45 °С. Так, если прогрев в темноте приводил к очень значительному снижению уровня варибельной флуоресценции — почти до уровня F_0 , а повышение уровня F_0 свидетельствует о частичном повреждении ряда реакционных центров, то при действии освещения интенсивностью 5—10 клк варибельная флуоресценция сохранялась почти на 80—82 %. Восстанавливалась также работа электронтранспортной цепи. Подобную ситуацию наблюдали в экспериментах на листьях ячменя [9]. Это явление можно объяснить тем, что освещение низкой интенсивности вызывает формирование трансмембранного градиента протонов [8], что вместе с катионами металлов [14] содействует стабилизации тилакоидных мембран и реакционных центров ФС II. При действии освещения большей интенсивности их активность не сохраняется. Такая ситуация может объясняться термооптическим эффектом [6], когда действие освещения высокой интенсивности усиливает влияние прогрева и вызывает изменение конформации ССК II, приводящее к переходу ССК II из тримерного состояния в мономерное и к его отсоединению от реакционного центра ФС II.

Таким образом, полученные результаты подтвердили, что защитный эффект на работу ФС II при прогреве оказывает только освещение низкой интенсивности. Максимальный эффект для растений гороха наблюдался при действии освещения интенсивностью 5—10 клк.

1. Кочубей С.М., Шевченко В.В., Бондаренко О.Ю. Влияние кратковременного прогрева на изменения размеров хлоропластов гороха // Физиология и биохимия культ. растений. — 2008. — 40, № 2. — С. 126—134.
2. Кочубей С.М., Шевченко В.В., Бондаренко О.Ю. Вплив короткочасного прогрівання за наявності світла на розміри хлоропластів гороху // Там само. — 2010. — 42, № 1. — С. 61—66.
3. Кочубей С.М., Шевченко В.В., Корнеев Д.Ю. Структурная организация и функциональные особенности световой фазы фотосинтеза. — Киев: Логос, 2007. — 176 с.
4. Креславский В.Д., Христин М.С. Последствие теплового шока на индукцию флуоресценции и низкотемпературные спектры флуоресценции листьев пшеницы // Биофизика. — 2003. — 48, № 5. — С. 865—872.
5. Ageeva O.G. Effect of light on thermostability of Hill reaction in pea and spinach chloroplasts // Photosynthetica. — 1977. — 11, N 1. — P. 1—4.
6. Dobricova A.G., Varkonyi Z., Krumova S.B. et al. Structural rearrangement in chloroplast thylakoid membranes revealed by differential scanning calorimetry and circular dichroism spectroscopy. Thermo-optic effect // Biochemistry. — 2003. — 42, N 38. — P. 11272—11280.
7. Gounaris K., Brain A.P.R., Quinn P.J., Williams W.P. Structural and functional changes associated with heat-induced phase-separation of non-bilayer lipids in chloroplast thylakoid membranes // FEBS Lett. — 1983. — 153, N 1. — P. 47—52.
8. Havaux M., Greppin H., Strasser R.J. Functioning of photosystems I and II in pea leaves exposed to heat stress in presence or absence of light // Planta. — 1991. — 186, N 1. — P. 88—98.

9. Kalitaho L.N., Pshybytko N.L., Kabashnikova L.F., Jahns P. Photosynthetic apparatus and high temperature: role of light // *Bulg. J. Plant Physiol.*, Special Issue. — 2003. — P. 281—289.
10. Kislyuk I.M. Protecting and injurious effect of light on photosynthetic apparatus during and after heat treatment of leaves // *Photosynthetica*. — 1979. — **13**. — P. 386—391.
11. Kochubey S.M., Shevchenko V.V., Bondarenko O.Yu. Changes in structure and functional characteristics of pea chloroplasts induced by short-term heating // Фотосинтез в постгенном-ную эру: структура и функции фотосистем // Программа и тезисы докл. Междунар. конф. (Москва, 20—26 авг. 2006). — М., 2006. — С. 266.
12. Leakey A.D.V., Press M.C., Scholes J.D. High-temperature inhibition of photosynthesis is greater under sun-flecks than uniform irradiance in a tropical rain forest tree seedling // *Plant Cell Environ.* — 2003. — **26**. — P. 1681—1690.
13. Sharkey T.D. Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene // *Ibid.* — 2005. — **28**, N 3. — P. 269—277.
14. Weis E. Influence of light on the heat sensitivity of the photosynthetic apparatus in isolated spinach chloroplasts // *Plant Physiol.* — 1982. — **70**. — P. 1530—1534.
15. Yamamoto Y. Quality control of photosystem II // *Plant Cell Physiol.* — 2001. — **42**, N 2. — P. 121—128.

Получено 07.07.2011

СВІТЛО НИЗЬКОЇ ІНТЕНСИВНОСТІ ЗАХИЩАЄ ФОТОСИСТЕМУ II ВІД ІНГІБУВАННЯ ЗА КОРОТКОЧАСНОГО ПРОГРІВАННЯ

V.V. Shevchenko

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, Київ

Методом індукції флуоресценції хлорофілу досліджено вплив короткочасного прогрівання листків гороху, вирощеного за максимальної денної температури 18 °С, в темряві й за освітлення різної інтенсивності на зміну активності ФС II і роботу електронтранспортного ланцюга. Прогрівання за 25 °С в темряві викликало уповільнення наростання сигналу в швидкій фазі, але майже не змінювало F_v/F_m , за 45 °С — спричинювало практично повне зникнення варіабельної флуоресценції. Прогрівання за 25 °С за інтенсивності світла 5—10 клк сприяло збереженню часу досягнення максимального рівня флуоресценції, за 45 °С — збереженню активності ФС II на рівні 80—82 % контролю. За дії світла вищої інтенсивності інгібування активності ФС II посилювалось. Отже, показано, що світло низької інтенсивності за короткочасного прогрівання чинить захисний ефект на активність ФС II.

THE LIGHT OF LOW INTENSITY PROTECTS PHOTOSYSTEM II AT SHORT-TERM HEATING

V.V. Shevchenko

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

Induction of chlorophyll fluorescence has been used to study the effect of short-term heating of leaves of pea plants, grown at maximal day temperature 18 °C, in the dark and under the light of varying intensity on photosystem II activity, as well as on the work of the electron transport chain. It was shown that heating at 25 °C in the dark caused a slowdown of signal growth in the fast phase, without a significant change in F_v/F_m , while heating at 45 °C led to almost full disappearance of variable fluorescence. Presence of light of 5—10 Klux during heating promoted maintenance of time of reaching F_m at 25 °C heating, and helped to preserve the activity at the level of 80—82 % of control at 45 °C. Higher light intensities led to an even greater decline of the activity. Thus it was shown that low intensity light has a protective effect on the activity PS II at short heating.

Key words: *Pisum sativum* L., induction of chlorophyll fluorescence, activity of PS II, short-term heating, protective effect of low light.