

УДК 581.132.144

ВПЛИВ КОРОТКОЧАСНОГО ПРОГРІВАННЯ ЗА НАЯВНОСТІ СВІТЛА НА РОЗМІРИ ХЛОРОПЛАСТІВ ГОРОХУ

С.М. КОЧУБЕЙ, В.В. ШЕВЧЕНКО, О.Ю. БОНДАРЕНКО

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17*

Вивчено вплив світла різної інтенсивності на розміри хлоропластів та дію цього чинника за прогрівання хлоропластів при 25 і 45 °С. Показано, що підсвічення в діапазоні інтенсивності 5—70 тис. лк призводить до зменшення розмірів хлоропластів, але меншою мірою, ніж у разі прогрівання. Виявлено зм'якшувальний ефект дії світла на тепловий стрес щодо зменшення розмірів хлоропластів. Навіть за пошкоджувальної температури 45 °С підсвічення в інтервалі 5—20 тис. лк істотно знижує ефект теплового стресу.

Ключові слова: хлоропласти, розміри, короткочасне прогрівання, спектри поглинання, вплив світла.

Нами виявлено, що короткочасний температурний вплив зумовлює зміну розмірів хлоропластів, причому залежно від напруженості діючого чинника ці зміни зворотні або незворотні [2, 4]. Грунтуючись на зіставленні наших даних з літературними, ми припустили можливий зв'язок розмірів хлоропластів зі структурно-функціональними змінами, які можуть виконувати регуляторну функцію [2]. Для розвитку цього припущення вивчили вплив наявності світла під час прогрівання хлоропластів на зміни їхніх розмірів. Є дані, що цей чинник зм'якшує тепловий стрес у рослинах гороху та ячменю, зокрема щодо функціональної активності [6, 7]. Тому виявлення ефекту зм'якшення світлом стосовно змін розмірів хлоропластів внаслідок теплового стресу могло бути підтвердженням цього припущення.

Мета нашої роботи — вивчення впливу світла різної інтенсивності на розміри хлоропластів, а також пошук зм'якшувального ефекту світла за короткочасного температурного навантаження на фотосинтетичний апарат.

Методика

Рослини гороху вирощували на вегетаційному майданчику. Хлоропласти виділяли з верхніх повністю сформованих листків 14-добових рослин гороху за методикою, описаною раніше [1]. Хлоропласти ресуспендували в 10 мМ трициновому буфері рН 7,6 з додаванням 0,1 М сахарози, 10 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂. Концентрацію хлорофілу в суспензії визначали спектрофотометрично [5].

Отриману суспензію хлоропластів розбавляли буфером до концентрації хлорофілу 1 мг/мл. Теплову обробку проводили упродовж 5 хв за температур 25 і 45 °С у темряві або при підсвіченні білим світлом різної

інтенсивності. Підсвічення здійснювали за допомогою лампи розжарювання OSRAM-200, світло від якої проходило крізь шар води з температурою 0 °С для світлового контролю або 25 і 45 °С — для варіантів теплової обробки за наявності світла. Тонкий шар суспензії хлоропластів, що підлягав обробці, вміщували в посудину з плоским дном, саму посудину занурювали у воду відповідної температури.

Для кожного варіанта комбінованої обробки теплом і світлом вимірювали 4 зразки суспензії хлоропластів: 1) контроль — без обробки теплом чи світлом; 2) тепловий контроль — теплова обробка зразка у темряві; 3) світловий контроль — світлова обробка зразка без впливу тепла; 4) теплова обробка зразка сумісно з підсвіченням.

Розміри хлоропластів визначали у серійних вимірюваннях великих партій зразків за розробленим нами раніше методом абсорбційної спектроскопії [5]. Згідно з цим методом, вимірювали спектри поглинання суспензії хлоропластів і обчислювали індекс $k = A_{680}/A_{850}$, що дорівнює відношенню величин поглинання у максимумі основної смуги спектра поглинання та при 850 нм, де віртуальне поглинання зумовлене розсіянням світла. Спектри поглинання за кімнатної температури вимірювали за допомогою двопроменевого спектрофотометра «Spectrum-200». Товщина шару поглинання — 1 см. Концентрація хлорофілу в зразках — 0,015 мг/мл, тому поглинання в максимумі червоної смуги не перевищувало 1,0 оптичної густини. Спектри отримували у цифровому вигляді, записували їх із кроком 0,5 нм.

Контрольні вимірювання розмірів хлоропластів для окремих зразків проводили із застосуванням їхніх зображень, отримуваних за допомогою мікроскопа «Jenaval» Analytik Jena. Він був облаштований пристроєм «Canon» (цифровою фотокамерою), тому дані отримували в електронному вигляді, що уможливило їх подальшу комп'ютерну обробку.

Зразок для мікроскопічного дослідження готували так. Краплю суспензії хлоропластів вміщували в камеру Горяєва з розміром малого квадрата 50 × 50 мкм. За концентрації хлорофілу у суспензії 0,2 мг/мл плівка суспензії мала таку товщину, в якій міг розміститися один хлоропласт у товщині вимірюваного шару.

За мікроскопічними зображеннями, отриманими у цифровому вигляді, визначали розміри часточок із застосуванням стандартних програмних пакетів Adobe Photoshop та MapInfo, останній був модифікований для обробки мікрозображень. Середній розмір площі хлоропластів розраховували за результатами вимірювань 500 часточок, відхилення від середнього обчислювали як середньоквадратичне з вірогідним інтервалом 5 %.

Результати та обговорення

Короткочасна дія світла призводить до зменшення розмірів хлоропластів так само, як і тепловий вплив (табл. 1). Світло інтенсивністю 5—30 тис. лк чинить слабку дію, понад 55 тис. лк — значно істотніше впливає на зменшення розмірів хлоропластів.

Дію підсвічення різної інтенсивності перевіряли для двох температур прогрівання: 25 і 45 °С (табл. 2, 3). Згідно з даними табл. 2, підсвічення різної інтенсивності в разі прогрівання при 25 °С по-різному впливає на зміну розмірів хлоропластів. За дії світла інтенсивністю 5, 10 і 20 тис. лк вони дещо збільшуються, а за дії світла інтенсивністю 30 тис. лк — зменшуються. Ці параметри практично збігаються з параметрами для варіанта прогрівання у темряві, якщо порівнювати зменшення розмірів при

ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННОГО ПРОГРЕВА

ТАБЛИЦЯ 1. Зміни розмірів хлоропластів, індуковані впливом світла різної інтенсивності

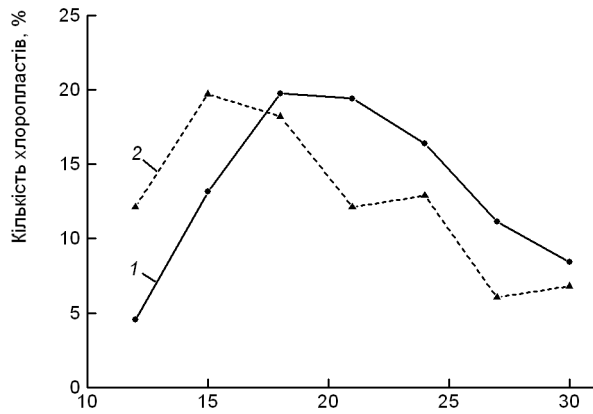
| Інтенсивність світла, тис. лк | Зміна розміру, контроль/підсвічення | Інтенсивність світла, тис. лк | Зміна розміру, контроль/підсвічення |
|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| 5 | 0,99 ± 0,01 | 30 | 0,93 ± 0,07 |
| 10 | 0,99 ± 0,01 | 55 | 0,83 ± 0,02 |
| 20 | 0,96 ± 0,01 | 70 | 0,82 ± 0,09 |

ТАБЛИЦЯ 2. Вплив підсвічення різної інтенсивності на зміну параметрів хлоропластів, прогрітих при 25 °С (за спектрами поглинання)

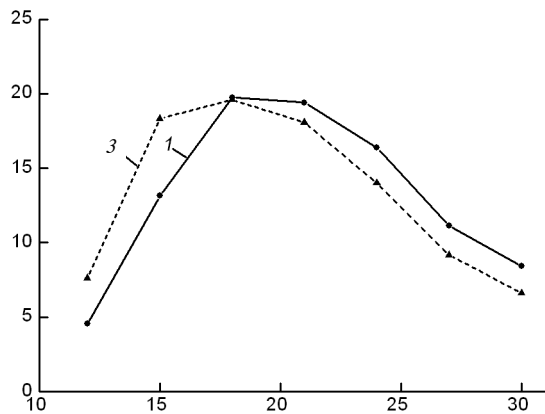
| Інтенсивність підсвічення, тис. лк | Номер досліді | $k = A_{680}/A_{850}$ | | | $r_{сер}$, контроль/прогрівання в темряві | $n_{сер}$, контроль/прогрівання з підсвіченням |
|------------------------------------|---------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------|--|---|
| | | Контроль | Прогрівання в темряві | Прогрівання з підсвіченням | | |
| 5 | 1 | 5,90 | 6,04 | 5,85 | 0,965 ± 0,005 | 1,005 ± 0,005 |
| | 2 | 4,64 | 4,66 | 4,63 | | |
| 10 | 1 | 5,90 | 6,04 | 5,80 | 0,965 ± 0,005 | 1,020 ± 0,000 |
| | 2 | 4,64 | 4,63 | 4,56 | | |
| 20 | 1 | 5,90 | 6,04 | 5,70 | 0,970 ± 0,010 | 1,010 ± 0,010 |
| | 2 | 4,64 | 4,66 | 4,64 | | |
| | 3 | 4,51 | 4,57 | 4,49 | | |
| 30 | 1 | 5,90 | 6,04 | 6,13 | 0,970 ± 0,010 | 0,970 ± 0,010 |
| | 2 | 4,64 | 4,66 | 4,77 | | |
| | 3 | 4,51 | 4,57 | 4,58 | | |

ТАБЛИЦЯ 3. Вплив підсвічення різної інтенсивності на зміну параметрів хлоропластів, прогрітих при 45 °С (за спектрами поглинання)

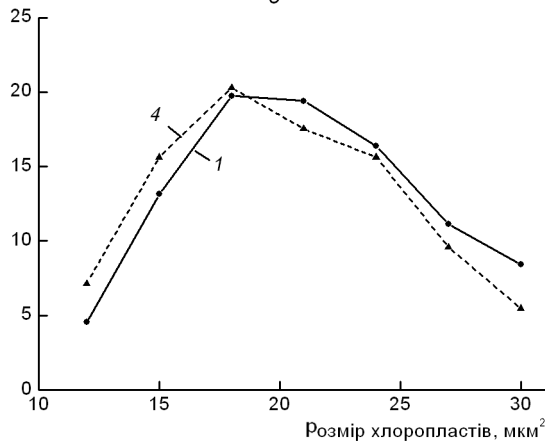
| Інтенсивність підсвічення, тис. лк | Номер досліді | $k = A_{680}/A_{850}$ | | | $r_{сер}$, контроль/прогрівання в темряві | $n_{сер}$, контроль/прогрівання з підсвіченням |
|------------------------------------|---------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------|--|---|
| | | Контроль | Прогрівання в темряві | Прогрівання з підсвіченням | | |
| 5 | 1 | 6,30 | 6,75 | 6,48 | 0,89 ± 0,04 | 0,94 ± 0,03 |
| | 2 | 4,64 | 5,55 | 5,09 | | |
| 10 | 1 | 6,30 | 6,75 | 6,42 | 0,90 ± 0,02 | 0,94 ± 0,03 |
| | 2 | 5,90 | 6,78 | 6,52 | | |
| | 3 | 4,12 | 4,60 | 4,37 | | |
| 20 | 1 | 5,90 | 6,78 | 6,13 | 0,86 ± 0,03 | 0,93 ± 0,04 |
| | 2 | 4,12 | 4,60 | 4,36 | | |
| | 3 | 4,51 | 5,14 | 4,66 | | |
| | 4 | 4,99 | 6,16 | 5,69 | | |
| 30 | 1 | 6,30 | 6,75 | 6,84 | 0,90 ± 0,02 | 0,92 ± 0,00 |
| | 2 | 4,51 | 5,14 | 4,85 | | |



а



б



в

Розподіл хлоропластів гороху за розмірами при прогріванні (а), світловій обробці (б) та сумісній дії обох чинників (в):

1 — контроль; 2 — прогрівання при 45 °С; 3 — підсвічення інтенсивністю 20 тис. лк; 4 — прогрівання при 45 °С та підсвічення інтенсивністю 20 тис. лк

це зміщення найменше, графіки розподілу для контрольного варіанта й варіанта комбінованої обробки доволі близькі. Ці результати збігаються

прогріванні у темряві, й відмінні від контролю (див. табл. 2).

У разі підсвічення суспензії хлоропластів, прогрітих при температурі 45 °С, що є ушкоджувальною, світлом інтенсивністю 5, 10 і 20 тис. лк, розміри хлоропластів збільшуються порівняно з варіантом прогрівання без підсвічення, при цьому вони наближаються до контрольного варіанта, хоча й залишаються дещо меншими (див. табл. 3). Найбільше відхилення (12 %) спостерігається для варіантів із підсвіченням 30 тис. лк.

Результати визначення розмірів хлоропластів та їх змін після впливу прогрівання при 45 °С у темряві та в разі підсвічення 20 тис. лк за даними світлової мікроскопії дали змогу детальніше проаналізувати досліджуваний феномен. На рисунку наведено графіки розподілу хлоропластів за розмірами. З аналізу графіків випливає, що проведені обробки спричинюють зміщення кривих розподілу хлоропластів у бік менших їх розмірів. Найбільше зміщення для варіанта прогрівання у темряві — від 21 до 15 мкм². Підсвічення за відсутності прогрівання викликає менше зміщення максимуму — від 21 до 18 мкм². За прогрівання з підсвіченням

з отриманими за спектральним параметром k , запропонованим нами для оцінювання розмірів хлоропластів (див. табл. 2, 3). Згідно з оцінками за параметром k , розміри хлоропластів зменшуються найбільшою мірою після прогрівання при 45 °С у темряві. Ступінь їх зменшення дещо нижчий за світлової обробки при 20 тис. лк, найнижчий — у варіанті прогрівання з підсвіченням.

Середні значення розмірів хлоропластів у фракції контрольного варіанта й різних варіантів обробки наведено в табл. 4. Усі типи обробки призводять до зменшення їхніх розмірів, характер цих змін збігається з результатами обчислення за спектральним параметром k та графіками розподілу хлоропластів за розмірами. Зменшення розмірів хлоропластів, оцінене за параметром k , після підсвічення 20 тис. лк становить 4–8 % (див. табл. 1), а після прогрівання при 45 °С і підсвічення 20 тис. лк — 6 %. Ці значення наближені до наведених у табл. 4, що ще раз підтверджує правомірність використання спектрального параметра для оцінювання розмірів хлоропластів.

Вивченням впливу підсвічення в широкому діапазоні встановлено інтервал слабкого впливу — це інтенсивності 5–20 тис. лк. Підсвічення з інтенсивністю понад 30 тис. лк слід вважати пошкоджувальним.

У разі прогрівання хлоропластів при 25 °С з підсвіченням інтенсивністю 5, 10, 20 і 30 тис. лк розміри хлоропластів змінюються менше порівняно з варіантом прогрівання у темряві, хоча ступінь змін в обох варіантах невеликий (див. табл. 2). Позитивний вплив дії світла на наслідки теплового стресу виявляється також і для варіанта прогрівання при 45 °С, причому в цьому варіанті теплової обробки вдалося зафіксувати більшу різницю зміни розмірів хлоропластів залежно від того, відбувався тепловий стрес у темряві чи за підсвічення (див. табл. 3).

Згідно з отриманими кривими розподілу хлоропластів за розмірами, фракція хлоропластів, ізольованих за нашою процедурою, містить часточки, розміри яких варіюють у межах 10–40 мкм². Однак півширина цих кривих відносно невелика — від 14 до 21 мкм², тобто в межах 7 мкм². Підсвічення за відсутності чи наявності теплового стресу практично не змінює півширину кривої розподілу хлоропластів за розмірами, а тільки зміщує всю криву в бік менших їх розмірів (див. рисунок, б, в). Це означає, що реакція на такі види впливів однотипна для хлоропластів різних розмірів. Прогрівання у темряві призводить до розшарування фракції. Як видно з рисунка (а), крім зміщення максимуму кривої розподілу виявляються два додаткові максимуми, що відповідають розмірам 24 і 30 мкм². Відносний внесок часточок, які належать до цих трьох частин фракції — відповідно 52, 33 і 15 %. Причини й механізми, що призводять до такого розшарування, потребують подальшого вивчення.

ТАБЛИЦЯ 4. Середні розміри хлоропластів у фракції (вимірювання зображень за допомогою світлового мікроскопа)

| Показник | Площа хлоропластів, мкм ² | Зміна площі, дослід/контроль |
|---|--------------------------------------|------------------------------|
| Контроль | 22,8 ± 5,2 | 1,00 |
| Прогрівання, 45 °С | 19,3 ± 5,2 | 0,85 |
| Підсвічення, 20 тис. лк | 21,0 ± 5,2 | 0,92 |
| Прогрівання, 45 °С та підсвічення, 20 тис. лк | 21,9 ± 5,2 | 0,96 |

Отже, на підставі результатів дослідження можна зробити такі висновки. У разі прогрівання хлоропластів з підсвіченням вплив теплового стресу на зміну їхніх розмірів зменшується. Цей ефект спостерігається як для температур, що зумовлюють слабкі зміни, так і для пошкоджувальних. Для ослаблення пошкоджувальної дії високої температури можна застосовувати підсвічення в інтервалі інтенсивностей 5–20 тис. лк.

Роботу виконано за підтримки Міністерства освіти і науки України, грант № М/273-2008.

1. Кочубей С.М., Бондаренко О.Ю., Шевченко В.В. Новый тип субхлоропластных фрагментов, выделенных из хлоропластов гороха с помощью дигитонина // Биохимия. — 2007. — 72, № 9. — С. 1255–1261.
2. 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.
3. Кочубей С.М., Шевченко В.В., Бондаренко О.Ю. Новые субхлоропластные частицы из хлоропластов гороха // Доп. НАН України. — 2005. — № 4. — С. 161–166.
4. Кочубей С.М., Шевченко В.В., Корнеев Д.Ю. Структурная организация и функциональные особенности световой фазы фотосинтеза. — Киев: Логос, 2007. — 176 с.
5. Arnon D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris* // Plant Physiol. — 1949. — 24, N 1. — P. 1–15.
6. Havaux M., Greppin H., Strasser R. Functioning of photosystems I and II in pea leaves exposed to heat stress in the presence of light // Planta. — 1991. — 186. — P. 88–98.
7. Kalituhu L.N., Pshybytko N.L., Kabashnikova L.F., Jahns P.P. Photosynthetic apparatus and high temperature: role of light // Bulg. J. Plant Physiol. — 2003. — Special iss. — P. 281–289.

Отримано 14.01.2009

ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННОГО ПРОГРЕВА ПРИ НАЛИЧИИ СВЕТА НА РАЗМЕРЫ ХЛОРОПЛАСТОВ ГОРОХА

С.М. Кочубей, В.В. Шевченко, О.Ю. Бондаренко

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Изучено влияние света разной интенсивности на размеры хлоропластов и действие этого фактора при прогреве хлоропластов при 25 и 45 °С. Показано, что подсветка в диапазоне интенсивности 5–70 тыс. лк вызывает уменьшение размеров хлоропластов, но в меньшей степени, чем в случае прогрева. Обнаружен смягчающий эффект действия света на тепловой стресс относительно уменьшения размеров хлоропластов. Даже при повреждающей температуре 45 °С подсветка в интервале 5–20 тыс. лк существенно снижает эффект теплового стресса.

INFLUENCE OF SHORT-TERM HEATING TOGETHER WITH LIGHTING ON SIZES OF PEA CHLOROPLASTS

S.M. Kochubey, 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

Here we studied influence of light of various intensities on chloroplasts sizes and how this factor effects together with heating 25 and 45 °C. It have been shown that lighting in a range 5,000–70,000 lux causes decreasing of chloroplast sizes but this decreasing is less than such under heating. It was established that the lighting of chloroplasts brings effect of tolerance in relation of size decreasing under heat stress. Even under destroyed temperature (45 °C) lighting in a range 5,000–20,000 lux significantly reduce effect of heat stress.

Key words: chloroplasts, size, short-term heating, absorption spectra, influence of light.