

УДК 581.1

## СПЕКТРАЛЬНИЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ТЕРМОУСТОЙЧИВОСТИ 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 MgCl<sub>2</sub>. Поскольку кукуруза относится к растениям с C<sub>4</sub> 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 C<sub>3</sub> 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].

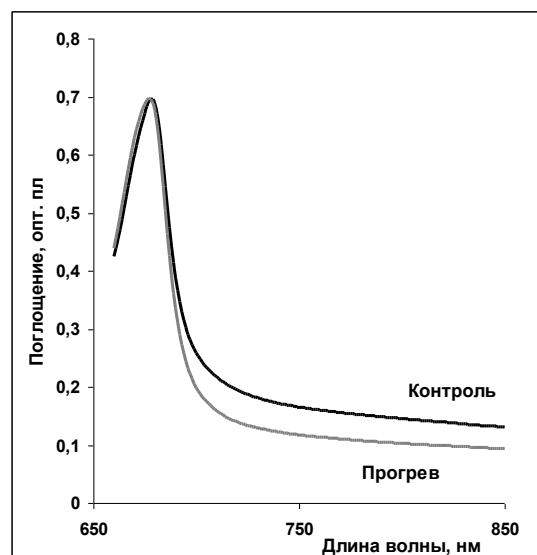


Рис. 1. Изменения спектров поглощения хлоропластов при кратковременном (5 мин) прогреве.

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).

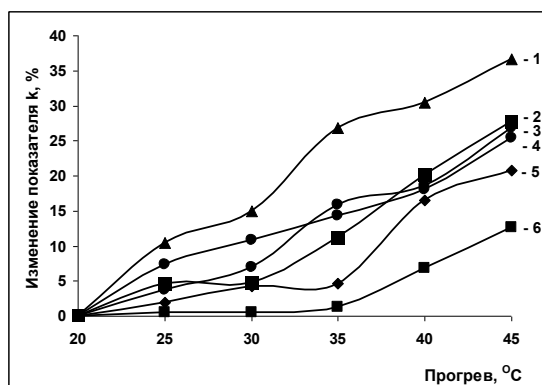
Наименьшие изменения происходили с хлоропластами кукурузы. В нижнем диапазоне прогревов, 25–30 °С, сжатия хлоропластов практически не наблюдалось, а при прогреве 45 °С уменьшение составляло не более 13 %. Хлоропласты из растений гороха, показали следующие изменения. В нижнем диапазоне было несколько 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. Моргунов 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. Моргунов 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 терmostійкості 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 терmostійкістю. 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 терmostійкості для кукурудзи та різних сортів озимої пшениці. Рекомендується використання спектрального параметру  $k$  для швидкого скрінінгу сортів на терmostійкість фотосинтетичного апарату в межах однієї культури.

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