

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА»

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ

КАФЕДРА ОБЩЕЙ ФИЗИКИ

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА
студентки 6 курса
Марковой Елизаветы Сергеевны

**ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛИСТЬЕВ БОБОВ В
УСЛОВИЯХ ТЕПЛОВОГО СТРЕССА**

Научный руководитель:
ассистент Левыкина И.П.

Допущена к защите
«25» декабря 2014 г.
Заведующий кафедрой общей физики
д.ф-м.н., проф. А.М. Салецкий

Москва 2014 г.

1. Введение.....	3
2. Обзор литературы	4
2.1. Фотосинтез	4
2.2. Влияние повышенных температур на фотосинтетический аппарат высших растений	9
2.3. Индукционные изменения флуоресценции фотосинтезирующих объектов.....	13
3. Методика проведения экспериментов	19
3.1. Объекты исследования	19
3.2. Регистрация индукции флуоресценции.....	20
3.3. Измерение индукции флуоресценции листьев растений с помощью РАМ-флуориметра.....	22
4. Результаты и обсуждение.....	23
4.1. Прогрев листьев при различных температурах	23
4.2. Влияние времени релаксации после предварительного прогрева листьев.....	25
4.3. Изменение времени «закаливания» при различных температурах	27
4.4. Эффект «закаливания» в зависимости от времени релаксации	30
4.5. Измерение коэффициентов фото– и нефотохимического тушения флуоресценции при закаливании.....	30
5. Результаты и выводы.....	34
6. Обозначения.....	36
7. Литература	37

1. Введение

Растения занимают одно из главных мест в жизнедеятельности человека. В этой связи центральной проблемой экологической физиологии фотосинтеза в настоящее время является изучение физико-химических



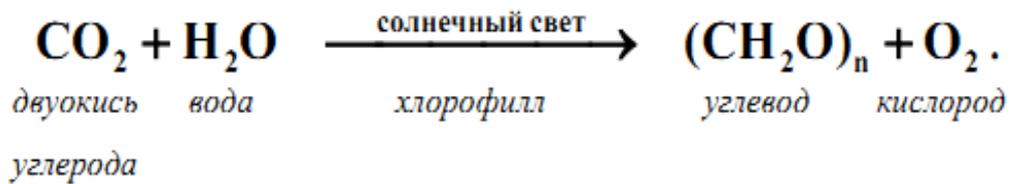
основ последовательных изменений отдельных фотосинтетических процессов при адаптации растений к различным природным факторам. Фотосинтетическая деятельность растений зависит от многих факторов, прежде всего от условий освещения (интенсивность, спектральный состав света), доступности и концентрации углекислого газа и кислорода, условий водоснабжения и минерального питания, от температуры. Воздействуя на отдельные реакции фотосинтеза, факторы внешней среды приводят к изменению активности фотосинтетических процессов, что в конечном счете определяет общую продуктивность растений.

В данной работе были изучены люминесцентные показатели и характеристики растений, основанные на регистрации индукционных изменений флуоресценции зелёного листа в условиях теплового стресса.

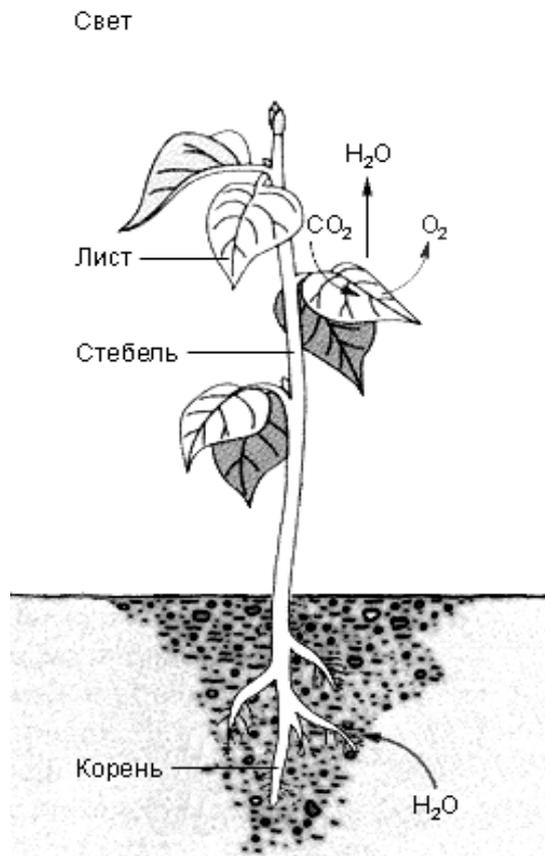
2. Обзор литературы

2.1. Фотосинтез

Фотосинтез осуществляют высшие растения, водоросли и некоторые бактерии. Этот процесс заключается в трансформации поглощенной световой энергии в химическую энергию органических соединений [1].
Общее уравнение фотосинтеза:



Суммарный процесс фотосинтеза высших растений можно разделить на две взаимосвязанные стадии: первичную (световую) и последующую (темновую).



Световой стадией фотосинтеза называют совокупность процессов, в результате которых за счет энергии света синтезируются молекулы аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) и восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН). Темновая стадия – это совокупность биохимических реакций, в результате которых происходит усвоение растением атмосферной углекислоты (CO₂) и образование углеводов [1, 2, 5].

У высших растений процессы фотосинтеза протекают в хлоропластах – специализированных энергопреобразующих органеллах растительной

клетки. Под двойной оболочкой хлоропласта находятся протяженные мембранные структуры, которые образуют замкнутые пузырьки, называемые тилакоидами [1]. Внутри одного хлоропласта содержится около 1000 тилакоидов. Различают тилакоиды гран, где граны – это стопки тилакоидов, и тилакоиды стромы, выходящие за пределы гран и являющиеся продолжением тилакоидов гран. Пространство между оболочкой хлоропласта и тилакоидами называется стромой. В строме содержатся молекулы РНК, ДНК, рибосомы, крахмальные зерна, а также многочисленные ферменты, включая те, которые обеспечивают усвоение CO_2 растениями. На один тилакоидный диск приходится в среднем 200 цепей электронного транспорта (ЦЭТ) и примерно 10^5 молекул пигментов. К пигментам, содержащимся в хлоропластах, относятся хлорофилл а, хлорофилл b, а также каротиноиды.



Растительная клетка [3] и строение хлоропласта [4]

Перенос электронов по электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) от H_2O и сопряженные с ним процессы, приводящие к образованию первичных стабильных продуктов НАДФН и АТФ с поглощением двух квантов света, осуществляется двумя фотосистемами (ФС). Каждая фотосистема состоит из светособирающей антенны, реакционного центра (РЦ), представляющего собой димер хлорофилла, нескольких переносчиков электронов белковой и

небелковой природы. Комплексы ФС2 находятся в основном в тилакоидах гран, а комплексы ФС1 располагаются в тилакоидах стромы [2].

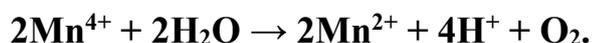
Светособирающая антенна ФС1 поглощает свет с длиной волны $\lambda < 700 \div 730$ нм, а ФС2 – свет с $\lambda < 680 \div 700$ нм. Вызванное светом окисление реакционных центров фотосистем сопровождается обесцвечиванием, которое характеризуется изменениями спектров поглощения при $\lambda \approx 700$ и 680 нм. Поэтому реакционные центры ФС1 и ФС2 получили название P700 и P680 [1]. Светособирающие антенны состоят в основном из молекул хлорофилла а.

Часть ССК, связанная с ФС1 (ССК1), находится в тилакоидах стромы, а часть, связанная с ФС2 (ССК2) – в тилакоидах гран. Определенная часть комплексов ССК2 является лабильной и способна увеличивать эффективное сечение поглощения либо ФС1, либо ФС2, выполняя роль дополнительной антенны. Такие лабильные комплексы, способные перемещаться из гранальной области в стромальную и обратно, являются важной частью регуляторного механизма, осуществляющего распределение энергии возбуждения между ФС [2]. Этот механизм основан на обратимом фосфорилировании белка ССК и позволяет изменять соотношение между нециклическим и циклическим электронными потоками, обеспечивая требуемое соотношение между количествами НАДФН и АТФ.

Поглощая квант света, молекула хлорофилла или вспомогательного пигмента переходит в возбужденное состояние. Энергия возбуждения мигрирует по антенне и попадает на РЦ: P680 в ФС2 и P700 в ФС1. Существует вероятность того, что на пути к реакционному центру энергия может потеряться – рассеяться в тепло или выделиться в виде кванта света (явление флуоресценции). В реакционном центре происходит разделение заряда и перенос электрона на первичные акцепторы. Отдельная молекула хлорофилла относительно редко поглощает кванты света даже при ярком освещении, однако на один фотореакционный центр приходится 200 – 400

молекул хлорофилла. Это обеспечивает достаточно частое срабатывание РЦ даже при низкой интенсивности света.

Донором электрона для окисленного РЦ ФС2 служит молекула воды, окисляемая в водорасщепляющем комплексе (ВРК). В активном центре ВРК, содержащем марганец, происходит разложение воды:



При разделении зарядов в РЦ ФС2 электрон переносится сначала на первичный акцептор феофитин (Phe), а затем на молекулу пластохинона Q_A . После этого электрон переносится на вторую молекулу пластохинона Q_B , способную принять два электрона. Отрицательно заряженная молекула Q_B обладает высоким сродством к ионам водорода, которые она захватывает из стромального пространства.

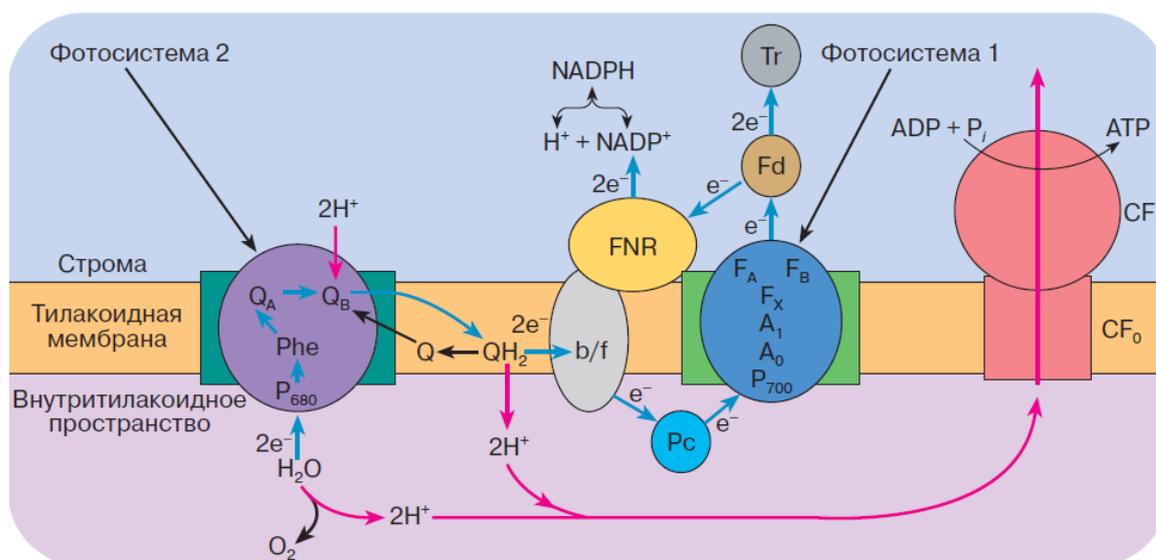


Схема строения цепи электронного транспорта в хлоропластах и АТФсинтазного комплекса[5]

Переносчики электронов ФС2: Phe – феофитин, Q_A , Q_B – молекулы пластохинона, Q – пластохинон, QH_2 – пластохинол (восстановленная и окисленная формы пластохинона), Pc – пластоцианин.

Переносчики электронов ФС1: A_0 , A_1 , F_X , F_A , F_B , Fd – ферредоксин; FNR – ферредоксин-НАДФ-редуктаза, Tr – тиоредоксин.

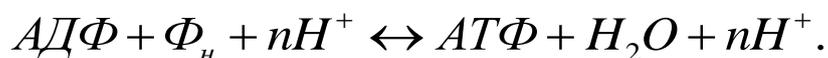
Цитохромный b_6/f комплекс: b_6/f -комплекс, содержащий цитохромы b и f.

Стрелками синего цвета показан перенос электронов. Стрелками красного цвета показаны пути протонного транспорта, сопряженного с работой АТФ-синтазы.

После протонирования восстановленного пластохинона образуется электрически нейтральная форма этой молекулы QH₂ (пластохинол). Пластохинол выполняет роль подвижного переносчика двух электронов и двух протонов: покинув ФС2, молекула QH₂ может легко перемещаться внутри тилакоидной мембраны, обеспечивая связь ФС2 с электрон-транспортным b/f-комплексом. На каждую молекулу пластохинона, окисляемую b/f-комплексом, внутрь тилакоида выделяются два иона водорода. В свою очередь, b/f-комплекс служит донором электрона для пластоцианина (Pc) – сравнительно небольшого водорастворимого белка, в состав активного центра которого входит ион меди. Пластоцианин выполняет роль связующего звена между b/f-комплексом и ФС1. От восстановленного пластоцианина электрон поступает непосредственно к окисленным реакционным центрам ФС1.

Первичный акцептор электронов в ФС1 (A₀) является соединением хлориновой природы. Следующий переносчик (A₁) – филлохинон, восстанавливает железосерный центр F_x. После электрон переносится на железосерные центры F_A и F_B, а затем на одноэлектронный переносчик ферредоксин (Фд), который играет важную роль в регуляции распределения электронов между нециклическим и циклическим потоками. Этот белок содержит два или четыре атома трехвалентного железа и четыре атома серы. Фд – подвижный переносчик, легко диффундирующий в водной фазе тилакоида к месту посадки на ферредоксин-НАДФ-редуктазу (ФНР), которая катализирует восстановление НАДФ⁺ на последней стадии линейного транспорта электронов [5, 6].

АТФ-синтаза – группа ферментов, синтезирующих аденозинтрифосфат (АТФ) из аденозиндифосфата (АДФ) и неорганических фосфатов в соответствии с уравнением:



АТФ-синтаза состоит из двух крупных белковых фрагментов:

локализованного в мембране фактора сопряжения CF_0 и выступающего в сторону стромы фактора сопряжения CF_1 . АТФ-синтаза работает как миниатюрный молекулярный мотор, вращающийся при прохождении через него электрического тока, создаваемого потоком протонов. Особая роль этого комплекса заключается в том, что, выкачивая протоны из клетки наружу, он не только поддерживает рН цитоплазмы близким к нейтральному, но и создает на мембране разность потенциалов, во многом определяя электрические свойства высших растений [5, 7].

Восстановленный НАДФН и синтезированный в сопряженном с электронным транспортом процессе фотофосфорилирования АТФ обеспечивают восстановление CO_2 в цикле Кальвина, ключевым ферментом которого является рибулозобисфосфаткарбоксилаза (Рубиско), локализованная в строме, как и другие ферменты восстановительного цикла.

2.2. Влияние повышенных температур на фотосинтетический аппарат высших растений

Особое место среди факторов, влияющих на фотосинтез, отведено температурному воздействию. Выделяют три кардинальные точки: минимальная температура, при которой процесс может начаться, оптимальная, т.е. наиболее благоприятная для данного процесса температура и максимальная, выше которой он становится невозможным. Для растений средней полосы минимальная температура для фотосинтеза около $0^{\circ}C$, а максимум фотосинтеза для них лежит в области $20 - 30^{\circ}C$. Спад фотосинтеза с повышением температуры от $35 - 40^{\circ}C$ связан с уменьшением активности реакционного центра ФС2. Известно, что прогрев до температур примерно $45^{\circ}C$ блокирует нециклический транспорт электронов. Полностью РЦ ФС2 перестают функционировать как ловушки при температуре $50^{\circ}C$. При $55^{\circ}C$ нарушается передача энергии возбуждения от хлорофилла b к хлорофиллу a. При температурах выше $60 - 65^{\circ}C$ перестает

функционировать ФС1 [8,9,10,11].

В области температур немного выше оптимальных снижение интенсивности фотосинтеза объясняют снижением тургора в листьях и закрыванием устьиц, что затрудняет поступление CO_2 к центрам его фиксации. При повышении температуры снижается растворимость CO_2 , увеличивается степень кислородного ингибирования, увеличивается текучесть липидов в тилакоидных мембранах. Реакции транспорта электронов и синтеза АТФ также являются термозависимыми процессами. Исследования показали, что не зависят от температуры только самые первичные фотохимические процессы – поглощение и миграция световой энергии, и переход хлорофилла в реакционных центрах в возбужденное состояние [6,7].

При кратковременном прогреве листьев замечают уменьшение хлоропластов, увеличение количества тилакоидов в гранах, которые изменяют свое расположение относительно осей хлоропласта, формируются тилакоиды с измененной молекулярной структурой, с характерным повышением отношения липиды/белок и липиды/хлорофилл. Так же при прогреве листьев растений в хлоропластах увеличивается количество крахмальных зерен, которое растет при повышении температуры [12].

При очень низкой интенсивности освещения формирование транс-мембранного градиента протонов невозможно, что вместе с катионами металлов не стабилизирует тилакоидные мембраны и реакционные центры ФС2 [13, 14, 15].

Кратковременное закаливание — это процесс, в результате которого на некоторое время повышается способность растений переносить неблагоприятные факторы внешней среды. Если нагреть клетки выше оптимальной температуры, они отреагируют повышением теплоустойчивости – произойдет процесс закалки. Тепловая закалка

осуществляется на клеточном уровне, поэтому ее можно получить как на целых растениях, так и на отдельных частях – листьях, корнях и т.д. Действие теплового стресса может быть ослаблено предварительной закалкой. Характер ответной реакции может зависеть от света и других сопутствующих факторов [16].

Для достижения эффекта надо учитывать, что время и температура связаны: чем выше температура закалки, тем меньше время воздействия. После некоторой оптимальной температуры закаливания эффект снижается или вовсе пропадает. Кривая зависимости эффекта от температуры закаливания по мере повышения температуры постепенно достигает максимума, после чего дальнейшее повышение температуры закалки уже быстро снижает эффект. Обычно это наблюдается при таких температурах закалки, которые вызывают значительное угнетение регистрируемой функции уже в процессе самой закалки [16].

При одном и том же сроке закалки температура, дающая эффект, должна быть тем выше, чем выше исходная теплоустойчивость объекта. С целью повышения теплоустойчивости проводят многократную тепловую обработку растительных объектов, чередуя супероптимальную температуру с оптимальной. Для некоторых видов наибольшее повышение термоустойчивости происходит в том случае, когда вслед за кратковременным прогревом при высокой температуре следует более длительный прогрев при умеренно высокой температуре. Если же температура последующей тепловой обработки выше, чем температура предыдущей, то эффект повторной закалки по сравнению с первым прогревом увеличивается очень незначительно или не меняется вовсе, а иногда даже снижается. Таким образом, уже в ответ на первое тепловое воздействие при оптимальных условиях закалки клетки, по-видимому, реагируют максимальным подъемом теплоустойчивости [17].

В ответ на увеличение температуры растения включают синтез

специфического набора белков, которые называют белками теплового шока (БТШ). Они помогают клетке выжить в условиях температурного стресса и вернуться после его прекращения в нормальное состояние. Синтез БТШ – стрессовая программа, включаемая тепловым шоком. Он происходит при подъеме температуры на 8 – 10°C выше нормальной. БТШ присоединяется к другим белкам, вызывая их разворачивание и препятствуя их агрегации, которая помешала бы белку приобрести естественную конформацию, нужную для его функциональной активности. Разворачивание белков с помощью БТШ необходимо для их проникновения через мембрану хлоропластов, митохондрий и эндоплазматического ретикула. Агрегация белков резко усиливается при повышении температуры. Активация синтеза в этих условиях БТШ должна защищать белки от необратимого повреждения. Поскольку БТШ влияют на конформационное состояние других белков, его относят к группе шаперонов (проводников). БТШ присутствует во всех частях клетки. Они обнаруживаются в ядре и ядрышке, где они накапливаются при тепловом шоке, в цитоплазме, в митохондриях, хлоропластах и эндоплазматическом ретикуле. Предположительно они защищают от теплового шока тилакоидные мембраны, в которых локализованы процессы трансформации световой энергии в химическую. После теплового шока синтез белков теплового шока прекращается и возобновляется синтез белков, которые характерны для клетки в нормальных условиях. Белки могут сохраняться достаточно долго, обеспечивая повышение устойчивости клеток к нагреву. Длительное пребывание клеток в условиях теплового шока также приводит к ослаблению и прекращению синтеза БТШ.

Закаленное состояние обратимо. Повышенная теплоустойчивость закаленных клеток постепенно снижается и у высших растений обычно доходит до уровня контроля через 5-7 дней после закалки. Скорость спада закаленного состояния зависит от температуры среды. Снижение

теплоустойчивости закаленных листьев при 0°C происходит значительно медленнее, чем при 20°C [16, 17,18, 19].

2.3. Индукционные изменения флуоресценции фотосинтезирующих объектов

При освещении зеленого листа после темновой адаптации интенсивность флуоресценции изменяется не монотонно (эффект Каутского).

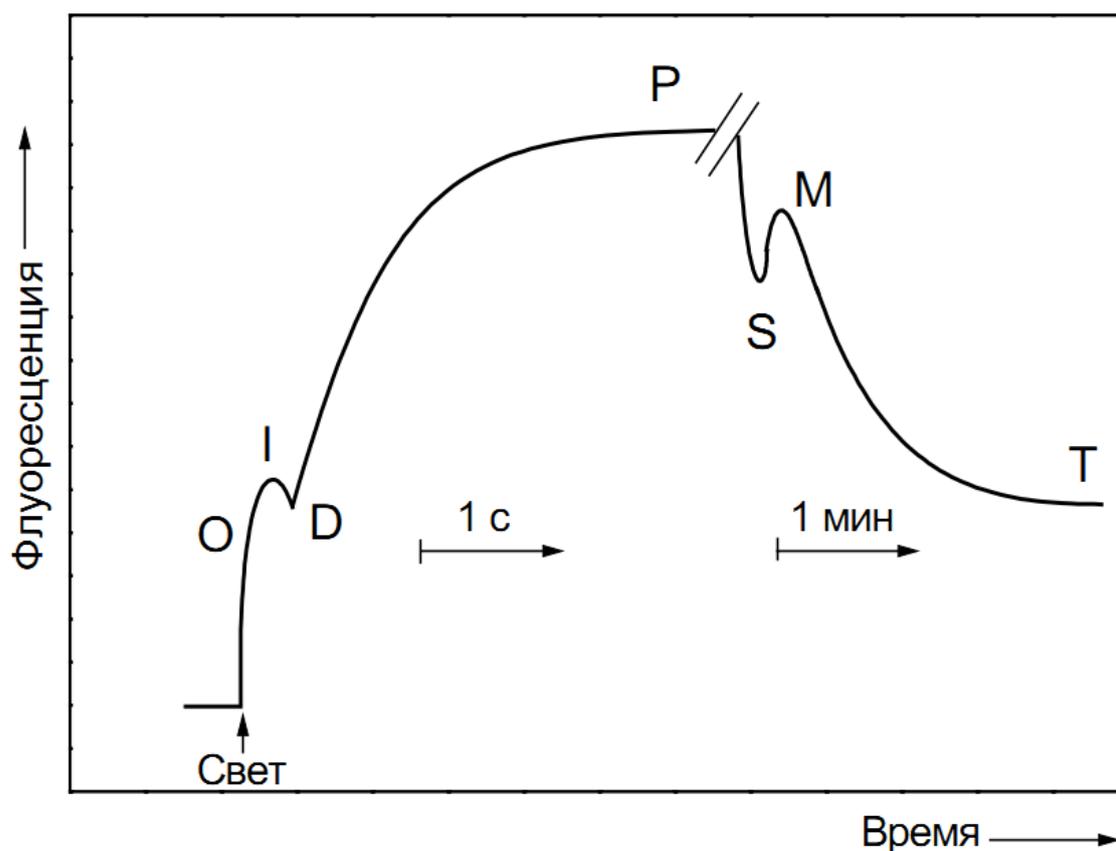


Рис.1. Схема индукционных изменений флуоресценции фотосинтезирующих объектов

Изменения O-I-D-P – первая волна, или быстрая индукция флуоресценции (БИФ).

Изменения P-S-M-T – вторая волна, или медленная индукция флуоресценции (МИФ).

Изменения O-I-D-P называют первой волной, или быстрой индукцией флуоресценции (БИФ). Она протекает за 1 – 3 с. Более медленные изменения P-S-M-T известны как вторая волна, или медленная индукция

флуоресценции (МИФ). Время протекания МИФ – от нескольких десятков секунд до нескольких минут.

Медленная индукция флуоресценции фотосинтезирующих объектов заключается в изменении интенсивности флуоресценции от максимального уровня Р до стационарного значения Т. Характерная кривая медленной индукции флуоресценции листьев растений представлена на рис.4. В изолированных интактных хлоропластах тушение Р-Т, как правило, монотонное. У листьев и водорослей наблюдается переход S-M-T или более сложная кинетика флуоресценции. Описание этих изменений затруднено из-за одновременного протекания многих процессов.

Стадия P-S связана с началом активации цикла Кальвина, при этом возрастает циклический поток электронов в ФС1. Наиболее быстро на свету активируется терминальный фермент ЭТЦ Фд-НАДФ⁺-редуктаза: уже через несколько секунд освещения он приобретает способность «оттягивать» через цепи переноса электроны от Q, и флуоресценция хлорофилла уменьшается. Тушение флуоресценции на этой стадии частично связано с образованием градиента протонов ΔрН на мембране.

Стадия S-M – замедление электронного транспорта между ФС вследствие установления протонного градиента. Это приводит к повышению уровня восстановленности Q, т.к. его окисление зависит от концентрации протонов у внутренней поверхности мембраны тилакоида. Восстановленные молекулы Q активируют фермент, катализирующий фосфорилирование белков ССК ФС2. На этой же стадии начинается использование синтезированного АТФ в цикле Кальвина.

Стадия M-T – продолжается структурная перестройка мембран и переход части ССК из области гран в область стромы. Включение цикла Кальвина снимает блокировку нециклического электронного потока.

Таким образом, можно констатировать, что МИФ фотосинтезирующих объектов является отражением целой системы регуляторных процессов,

обеспечивающих оптимальное функционирование фотосинтетического аппарата [2].

Использование МИФ для оценки физиологического состояния фотосинтетического аппарата затруднено ввиду значительной биологической вариабельности и сложностей в интерпретации этого явления, хотя метод индукции флуоресценции широко используется для решения как фундаментальных, так и прикладных задач биофизики фотосинтеза и физиологии растений. В этой связи представляется необходимым изучение медленной индукции флуоресценции растений в различных условиях регистрации и выбор адекватных характеристик кривой индукции флуоресценции.

Тушение флуоресценции (стадии P-S и M-T) подразделяют на фотохимическое (PQ), которое зависит от окислительно-восстановительного состояния первичных акцепторов электронов ФС2, и нефотохимическое (NPQ), непосредственно с этим состоянием не связанное.

Коэффициенты PQ и NPQ обычно определяют с помощью РАМ-флуориметра (Pulse Amplitude Modulation), в котором используется измерительный и действующий свет сложного состава, включающий:

1. Импульсы измерительного света с низкой частотой (1,6 кГц) длительностью 1 мкс низкой интенсивности (10 мВт/м²). При таком свете измеряется параметр F_0 .

2. Импульсы насыщающего света (интенсивности 2000 Вт/м²), следующие с интервалом 5 с и увеличивающие выход флуоресценции от измерительного света за счёт полного восстановления первичного акцептора. При таком свете измеряются параметры F_m и F_m' .

3. Постоянный действующий (актиничный) свет (15-100 Вт/м²), вызывающий быстрое возрастание флуоресценции хлорофилла с последующим спадом.

Измерительная система РАМ-флуориметра селективно регистрирует выход флуоресценции на частоте следования микросекундных импульсов [20]

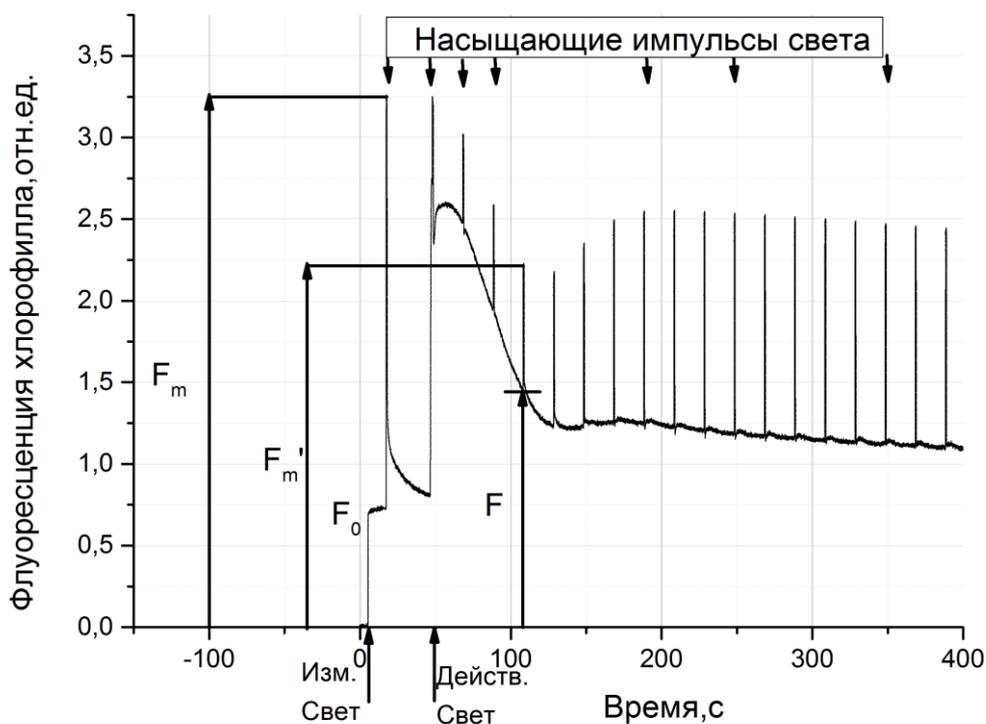


Рис. 2. Индукционные изменения флуоресценции, полученные с помощью РАМ-флуориметра

F_0 – выход флуоресценции хлорофилла под действием возбуждающего света низкой интенсивности;

F_m – максимальный выход флуоресценции после насыщающего импульса света, после темноты;

F_m' – максимальный выход флуоресценции после насыщающего импульса света у освещённого листа;

F – выход флуоресценции хлорофилла при освещении листа постоянным действующим светом.

Включение модулированного измерительного света низкой интенсивности возбуждает уровень флуоресценции F_0 . Этот уровень определяется флуоресценцией хлорофилла в условиях, когда все РЦ находятся в «открытом» рабочем состоянии и способны тушить флуоресценцию антенны, поскольку все молекулы первичного хинонного

акцептора Q_A готовы принять электрон от P680. Если все молекулы Q_A восстановлены (под действием насыщающего импульса света), то РЦ «закрыты». Поэтому энергия электронного возбуждения большей частью возвращается в антенну и уровень флуоресценции становится максимальным (F_m). Разница между F_m и F_0 называется переменной флуоресценцией ($F_v = F_m - F_0$). Она обусловлена той частью световой энергии, которая использовалась в первичных реакциях фотосинтеза при открытых РЦ. В адаптированных к темноте листьях все центры фотохимически активны и флуоресценция соответствует уровню F_0 . При освещении их насыщающей вспышкой флуоресценция становится максимальной (F_m) и быстро релаксирует в темноте до исходного уровня. Параметр F_v/F_m характеризует «эффективность использования света ФС2» или, по-другому, «максимальный квантовый выход фотохимических превращений в ФС2».

При постоянном освещении действующим светом центры частично или полностью переходят в «закрытое» состояние по мере восстановления Q_A , что сопровождается увеличением уровня флуоресценции до величины F . Освещение образца на этом фоне насыщающей вспышкой света увеличивает уровень флуоресценции до величины F_m' , меньшей чем F_m , т.к. имеет место нефотохимическое тушение флуоресценции (образование ΔpH и перераспределение энергии возбуждения в пользу ФС1). Кривую МИФ регистрируют при включении постоянного действующего света. Периодические импульсы света насыщают фотохимические процессы, из-за чего достигается обращение фотохимического тушения. Уменьшение F_m' относительно F_m указывает на нефотохимическое тушение. Восстановленный первичный акцептор Q_A^- легко отдает электрон на Q_B , который затем передает его в пул свободных пластохинонов. После однократного возбуждения РЦ короткой интенсивной вспышкой окисление Q_A сопровождается быстрой релаксацией переменной флуоресценции за

счет переноса электронов с Q_A на Q_B . Небольшой долгоживущий компонент в кинетике окисления Q_A связан с наличием в популяции реакционных центров некоторого числа «неактивных», в которых перенос с Q_A к Q_B невозможен. Более сложная ситуация наблюдается, когда ФС2 возбуждается многократно. Восстановленные молекулы Q_B передают электроны в пластохиноновый пул. Поэтому степень восстановленности Q_B , зависит от редокс состояния пула. Его окисленность зависит, в свою очередь, от линейного электронного транспорта через ФС1 и далее к конечным акцепторам, таким как CO_2 . После длительного периода темноты Рубиско неактивна, и фиксация CO_2 не происходит. По этой причине пул пластохинонов может быть восстановлен даже в первый момент освещения. В таком случае последующие электроны с Q_A^- смогут переноситься только обратно в донорную часть ФС2, что скажется на кинетической кривой. Таким образом, очевидно, что кинетика темновой релаксации переменной флуоресценции связана с состоянием Q_B и пластохинонового пула [21, 22].

Коэффициенты тушения рассчитывают следующим образом:

а) для нефотохимического тушения:

$$NPQ = \frac{F'_m}{F_m} - 1,$$

б) для фотохимического тушения:

$$PQ = \frac{(F'_m - F)}{(F_m - F_o)}.$$

3. Методика проведения экспериментов

3.1. Объекты исследования

Растения бобов сорта «Русские черные» выращивали в лабораторных условиях при естественном освещении. В опытах использовали листья второго яруса трехнедельных проростков.

1. Прогрев листьев при различных температурах: листья бобов, не отделяя от стебля, помещали в целлофановую упаковку соответствующего размера, погружали в термостатируемый открытый сосуд с водой и выдерживали в течение 15 минут при фиксированной температуре из диапазона 24 – 45°C. Далее, листья использовали для регистрации МИФ. Для измерения МИФ использовали высечки из средней части листа. Высечку из листа помещали в держатель, адаптировали к темноте в течение 5 мин, а затем включали возбуждающий флуоресценцию свет и регистрировали МИФ.

2. Изменение времени релаксации после предварительного прогрева листьев: листья бобов, не отделяя от стебля, помещали в целлофановую упаковку соответствующего размера, погружали в термостатируемый открытый сосуд с водой и выдерживали в течение 15 минут при фиксированной температуре из диапазона 41°C, 42°C и 43°C. Часть растений, листья которых были прогреты таким образом, на 30 мин возвращали в исходные лабораторные условия, а другую часть на 60 минут. После этого регистрировали МИФ.

3. Изменение времени «закаливания» при различных температурах: листья бобов, не отделяя от стебля, помещали в целлофановую упаковку соответствующего размера, погружали в термостатируемый открытый сосуд с водой и выдерживали в течение: 15, 30, 45 минут при фиксированной температуре: 35, 37, 39, 41 и 43°C. Часть растений, листья которых были прогреты таким образом, использовали для регистрации МИФ, а другую часть на 30 мин возвращали в исходные

лабораторные условия, а затем подвергали 10-минутному прогреву при 43°C и после этого регистрировали МИФ.

4. Эффект «закаливания» в зависимости от времен релаксации: листья бобов, не отделяя от стебля, помещали в целлофановую упаковку соответствующего размера, погружали в термостатируемый открытый сосуд с водой и выдерживали в течение 30 минут при фиксированной температуре 37°C. Растения возвращали в исходные лабораторные условия на 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5 и 3 часа, а затем подвергали 10-минутному прогреву при 43°C. После этого регистрировали МИФ.

5. Измерение коэффициентов фото- и нефотохимического тушения флуоресценции: листья бобов, не отделяя от стебля, помещали в целлофановую упаковку соответствующего размера, погружали в термостатируемый открытый сосуд с водой и выдерживали в течение 45 минут при фиксированной температуре 37°C. Часть растений, листья которых были прогреты таким образом, использовали для регистрации индукционных изменений флуоресценции, с помощью РАМ-флуориметра, а другую часть на 30 мин возвращали в исходные лабораторные условия, а затем подвергали 10-минутному прогреву при 43°C и после этого снимали показания. Аналогично выдерживали листья в течение 10 минут при фиксированной температуре 43°C. Далее листья использовали для регистрации индукционных изменений флуоресценции с помощью РАМ- флуориметра.

3.2. Регистрация индукции флуоресценции

Для возбуждения флуоресценции использовали галогеновую лампу 90 Вт с фокусирующей линзой. Сектор возбуждения формировали с помощью широкополосного фильтра СЗС-22 с максимумом результирующего пропускания около 450 нм. Флуоресценцию выделяли на длине волны 686 нм монохроматором МУМ-5 и регистрировали при помощи

фотоумножителя ФЭУ-79 (в режиме счета фотонов). Сигнал, пропорциональный интенсивности флуоресценции, после соответствующего усиления подавали на компьютер, с помощью которого регистрировали индукцию флуоресценции.

Держатель образца представлял собой зачерненную пластинку с двумя зажимами, которые позволяли фиксировать лист. Образцы располагали под углом 45° к возбуждающему свету. Листья срезаны непосредственно перед измерением.

Измерения проводили по схеме:

- а) помещение листа в держатель;
- б) 30 сек. освещения;
- в) 5 мин. адаптации к темноте;
- г) освещение и регистрация МИФ.

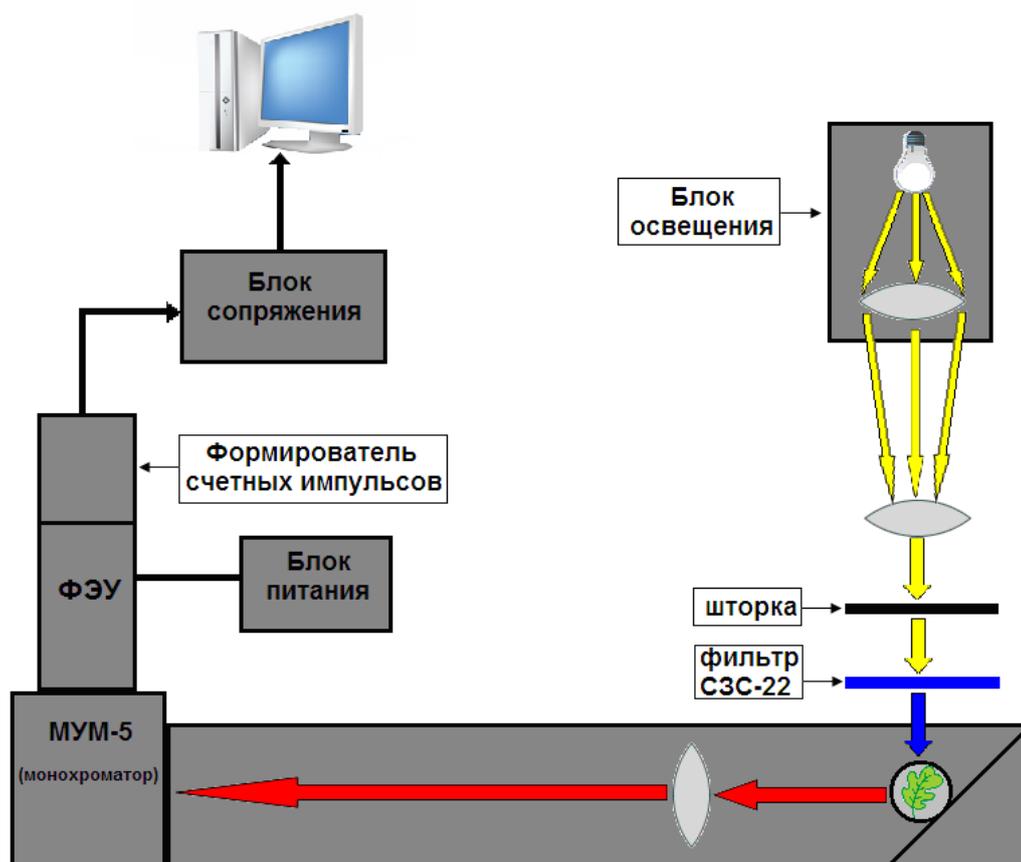


Рис.3. Блок-схема установки для измерения медленной индукции флуоресценции листа.

Характерная кривая МИФ представлена на рис.4.

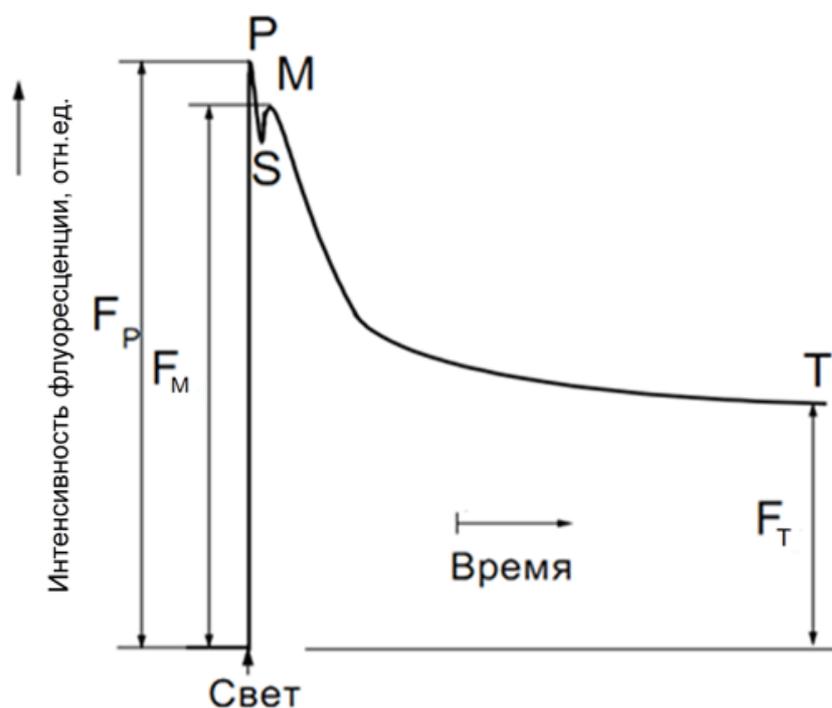


Рис.4. Характерная кривая медленной индукции флуоресценции листа

3.3. Измерение индукции флуоресценции листьев растений с помощью РАМ-флуориметра

Индукцию флуоресценции регистрировали с помощью портативного импульсного флуориметра РАМ-2500 (Германия). Флуориметр был снабжен специальным зажимом для листа. Флуоресценция возбуждается слабыми по интенсивности импульсами измерительного света, а состояние фотосинтетического аппарата изменяется с помощью постоянного действующего света и мощных по интенсивности импульсов, восстанавливающих первичные акцепторы ФС2. Общее время регистрации составляло 650 с. Характерная запись кривой, выведенной на экран монитора, представлена на рис. 2. Рассчитывались коэффициенты NPQ и PQ. Смысл коэффициентов был рассмотрен в разделе 2.3.

4. Результаты и обсуждение

4.1. Прогрев листьев при различных температурах

Измерение МИФ листьев бобов производили после их прогрева при различных температурах от 24°C до 45°C в течение 15 мин. Было установлено, что предварительный прогрев листьев при температурах ниже 36°C не влияет на форму медленной индукции флуоресценции, но влияет на величину максимумов Р и М (рис. 5). При температуре 38°C происходит уменьшение фаз PS и MT за счет уменьшения амплитуд Р и М. Увеличение температуры до 40°C приводит к исчезновению максимума М. Дальнейший прогрев приводит к уменьшению интенсивности пика Р и увеличению стационарного значения Т (рис 6). После прогрева при температуре 43°C и выше, индукционные изменения флуоресценции отсутствуют.

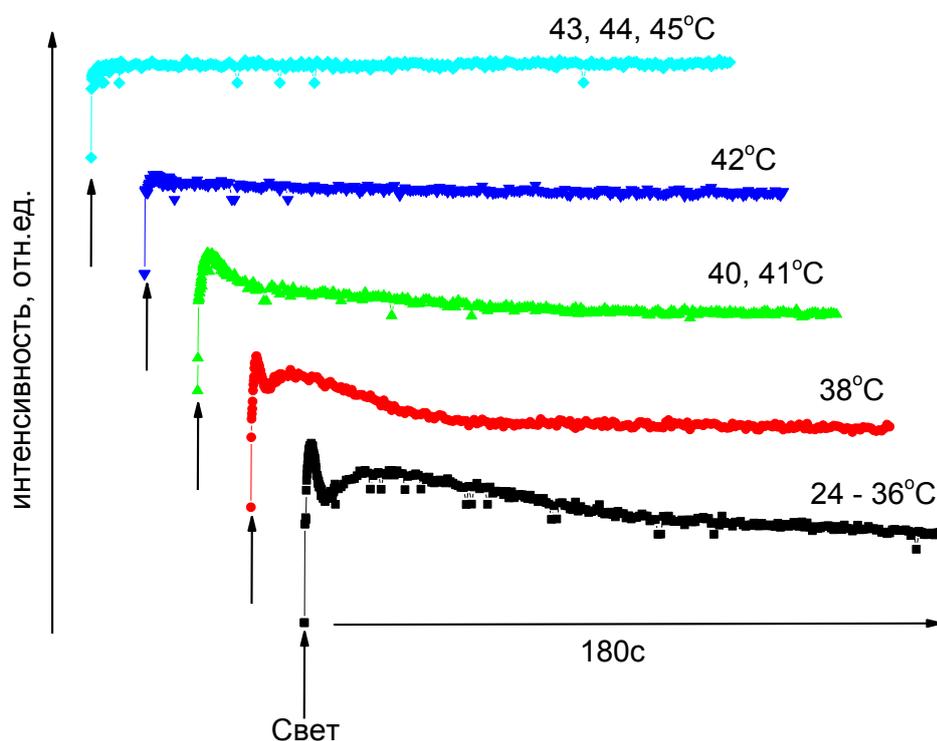


Рис.5. Характерные кривые медленной индукции флуоресценции листьев бобов после прогрева в течение 15 мин при температуре 24 – 45°C

Изменения формы кривой МИФ (участок P-S-M) отражают термочувствительность первичных процессов фотосинтеза, связанных с

электронным и протонным транспортом. Как описано в статье Бухова Н.Г. и др.[23], уменьшение PS при 38°C свидетельствует об уменьшении оттока электронов от ФС1, в следствии световой активации Фд-НАДФ⁺-редуктазы. Сопутствующее уменьшение интенсивности М указывает на увеличение оттока электронов от ФС1 по сравнению с притоком от донорной части, за счет увеличения градиента на мембране тилакоида. Отсутствие кинетического максимума М при температурах выше 41°C означает уменьшение скорости донирования ФС2 и не может обеспечить существенного накопления градиента протонов на мембране. Исчезновения спада PS при температурах выше 42°C указывает на частичную или полную потерю активности фермента Фд-НАДФ⁺-редуктазы. Сохранение небольшой части переменной флуоресценции можно объяснить остаточной активностью ФС2.

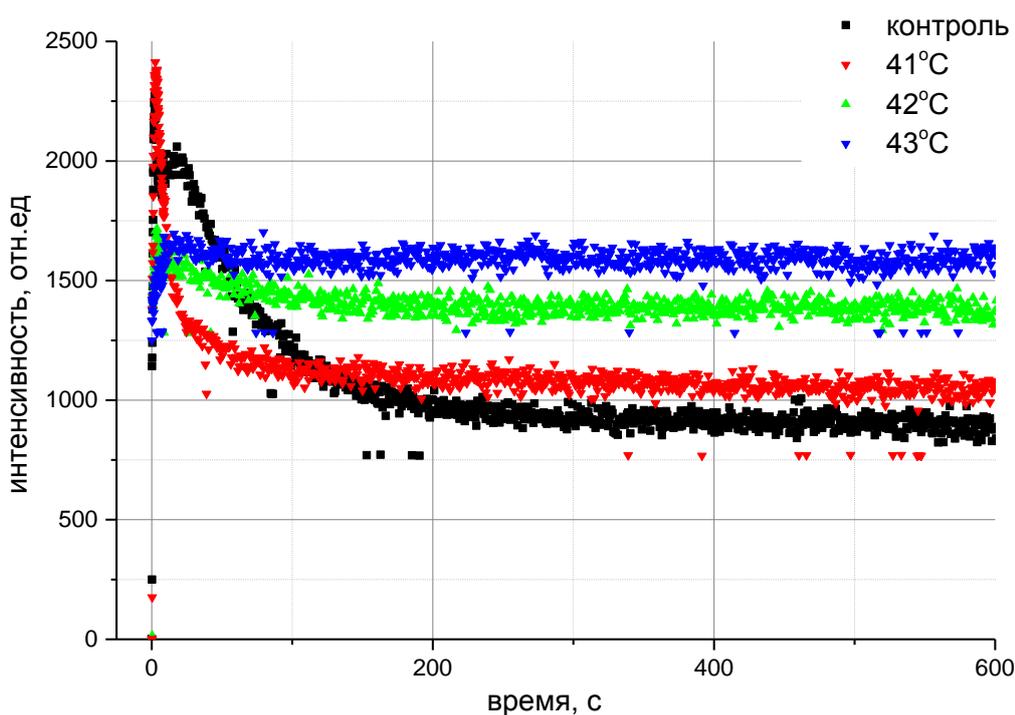


Рис.6. Характерные кривые медленной индукции флуоресценции листьев бобов при температурах после прогрева 41°C, 42°C, 43°C

Дополнительно были рассчитаны значения параметров $(F_P - F_T)/F_T$ и $(F_M - F_T)/F_T$ медленной индукции флуоресценции листьев бобов (рис. 7). Возрастание обоих параметров происходит в диапазоне температур от 24°C

до 36°C. При увеличении температуры прогрева от 38°C до 43°C наблюдалось резкое уменьшение показателя $(F_P - F_T)/F_T$ до нуля.

Увеличение параметров $(F_P - F_T)/F_T$ и $(F_M - F_T)/F_T$ характеризует увеличение фотосинтетической активности листа, оцениваемой по скорости выделения O_2 в расчете на хлорофилл [24]. Резкое снижение параметра $(F_P - F_T)/F_T$ до нуля указывает на потерю функциональной активности фотосинтетического аппарата.

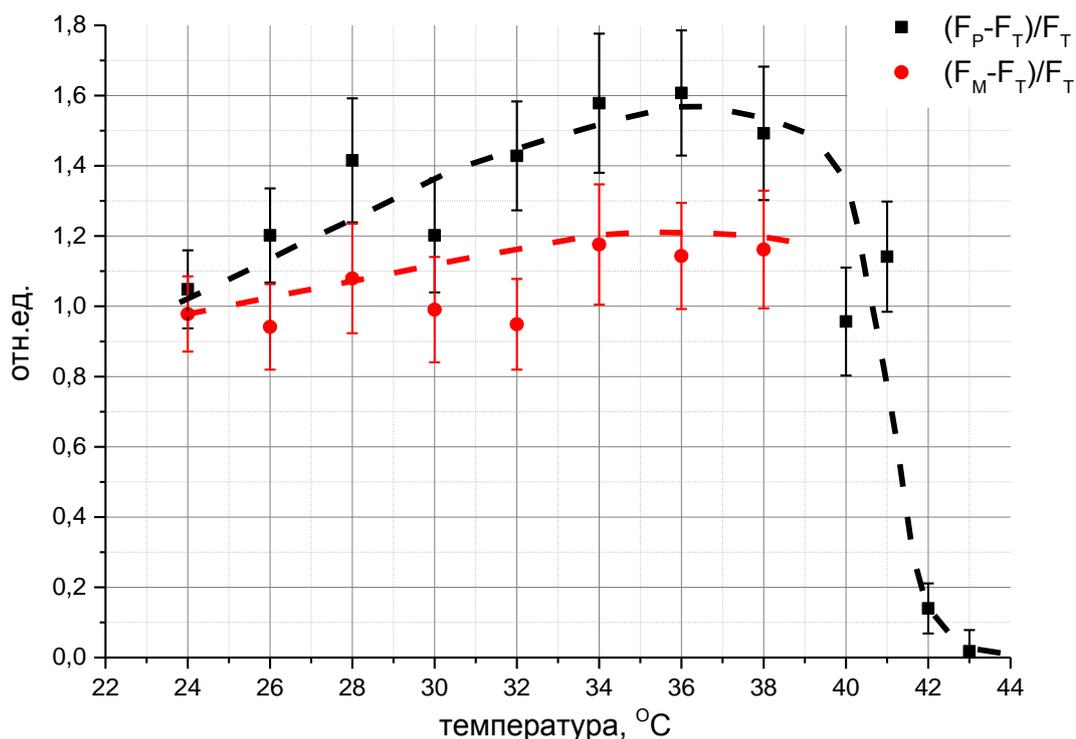


Рис. 7. Значения $(F_P - F_T)/F_T$ и $(F_M - F_T)/F_T$ МИФ листьев бобов после прогрева в течение 15 мин от 24°C до 43°C

4.2. Влияние времени релаксации после предварительного прогрева листьев

Предварительный прогрев листьев бобов производили при температурах 41°C, 42°C, 43°C в течение 15 мин, далее листья выдерживали в лабораторных условиях в течение разного времени (0, 30, 60 мин), а затем регистрировали кривые МИФ. На рис. 8 приведены значения показателя $(F_P - F_T)/F_T$ в зависимости от времени релаксации.

- *Прогрев листьев при 41°C.*

Значения параметра $(F_P - F_T)/F_T$ снижены на 70% по сравнению с контролем при времени релаксации 0 и 30 мин. Через 60 мин релаксации параметр увеличивается до 50% от контроля, что свидетельствует о частичном восстановлении ФА.

- *Прогрев листьев при 42°C.*

Наблюдается уменьшение значения $(F_P - F_T)/F_T$ на 84% по сравнению с контролем при времени релаксации 0 мин. При 30 минутах релаксации достигается минимальное значение параметра, которое на 90% меньше контрольного значения, и сохраняется до 60 минут в пределах погрешности.

- *Прогрев листьев при 43°C.*

Показатель $(F_P - F_T)/F_T$ принимает наименьшее значение, т.е. параметр уменьшается на 95% относительно контроля и не зависит от времени релаксации.

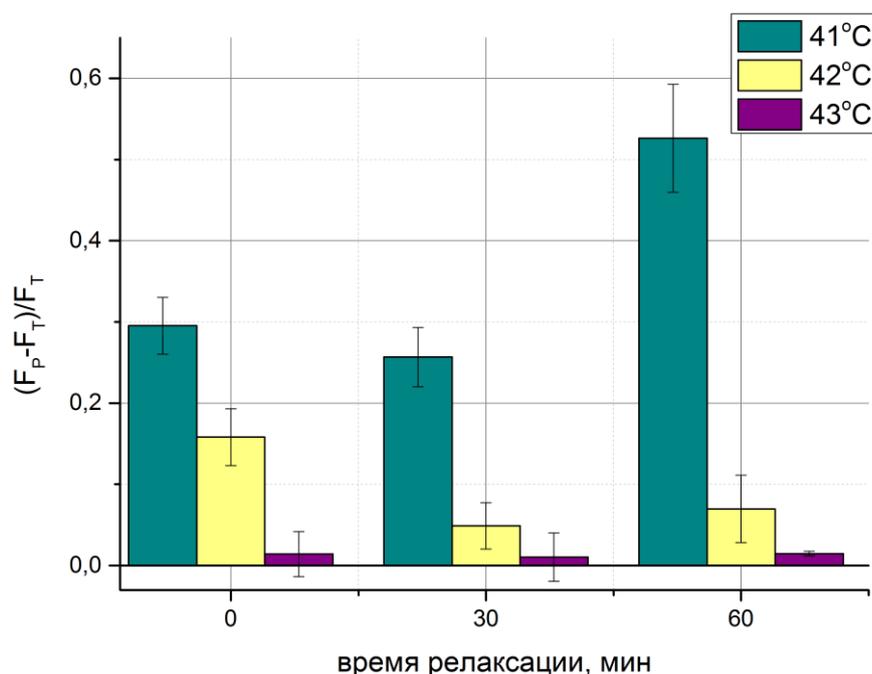


Рис.8. Зависимость показателя $(F_P - F_T)/F_T$ от длительности времени релаксации после прогрева

4.3. Изменение времени «закаливания» при различных температурах

Для нахождения оптимальной температуры закаливания был выбран диапазон температур 35 – 43°C с различными временами прогрева продолжительностью 15, 30, 45 минут.

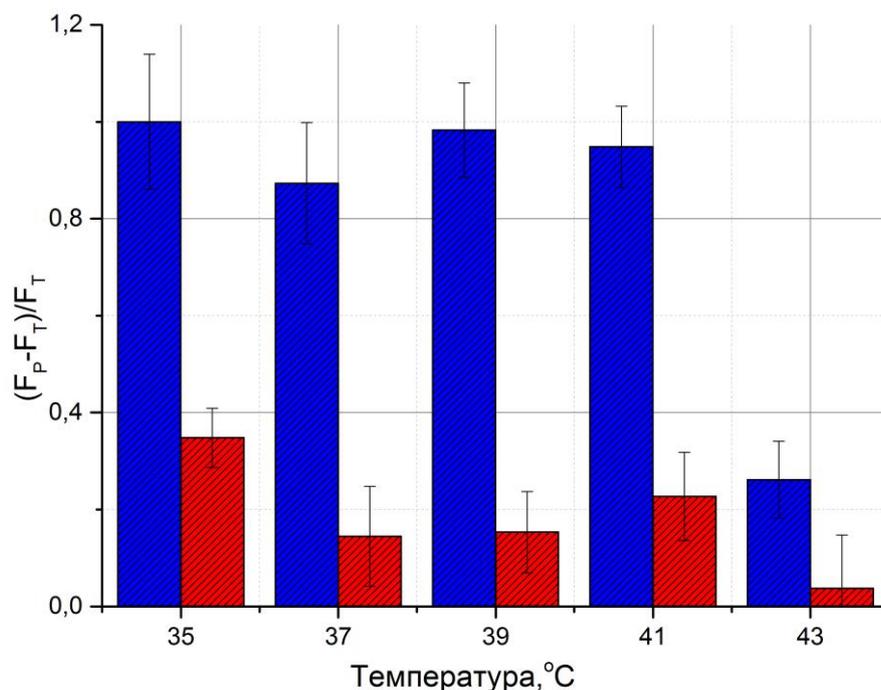


Рис.9. Значения показателя $(F_p - F_T)/F_T$ медленной индукции флуоресценции листьев бобов после теплового воздействия. Левые столбики: после 15 мин прогрева при соответствующей температуре (35–43°C). Правые столбики: после 15 мин прогрева при соответствующей температуре (35–43°C), 30 мин выдерживания в лабораторных условиях и последующего 10-минутного прогрева при 43°C.

Предварительный прогрев листьев в течение 15 минут при температурах 35°C, 37, 39, 41, 43°C и последующий прогрев при 43°C приводили к значительному снижению параметра $(F_p - F_T)/F_T$ на 60 % относительно параметров листьев без воздействия теплового шока, что свидетельствует об отсутствии эффекта «закаливания» (рис.9).

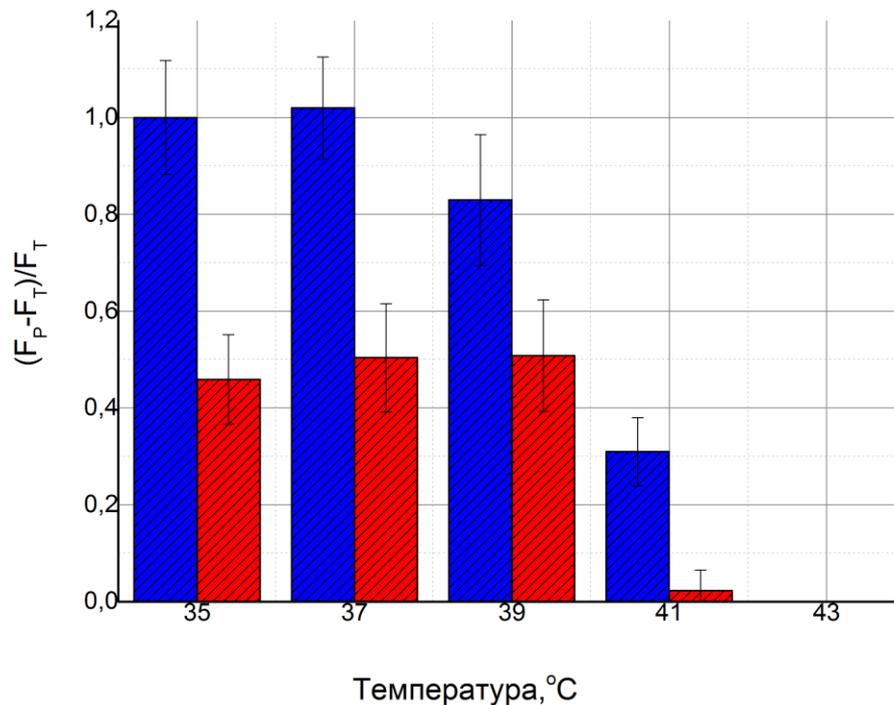


Рис.10. Значения показателя $(F_p - F_T)/F_T$ медленной индукции флуоресценции листьев бобов после теплового воздействия. Левые столбики: после 30 мин прогрева при соответствующей температуре (35–43°C). Правые столбики: после 30 мин прогрева при соответствующей температуре (35–43°C), 30 мин выдерживания в лабораторных условиях и последующего 10-минутного прогрева при 43°C.

Увеличение времени предварительного прогрева листа до 30 минут с последующим прогревом при 43°C приводило к уменьшению показателя $(F_p - F_T)/F_T$ почти на 50%, относительно листьев без воздействия теплового шока (рис.10).

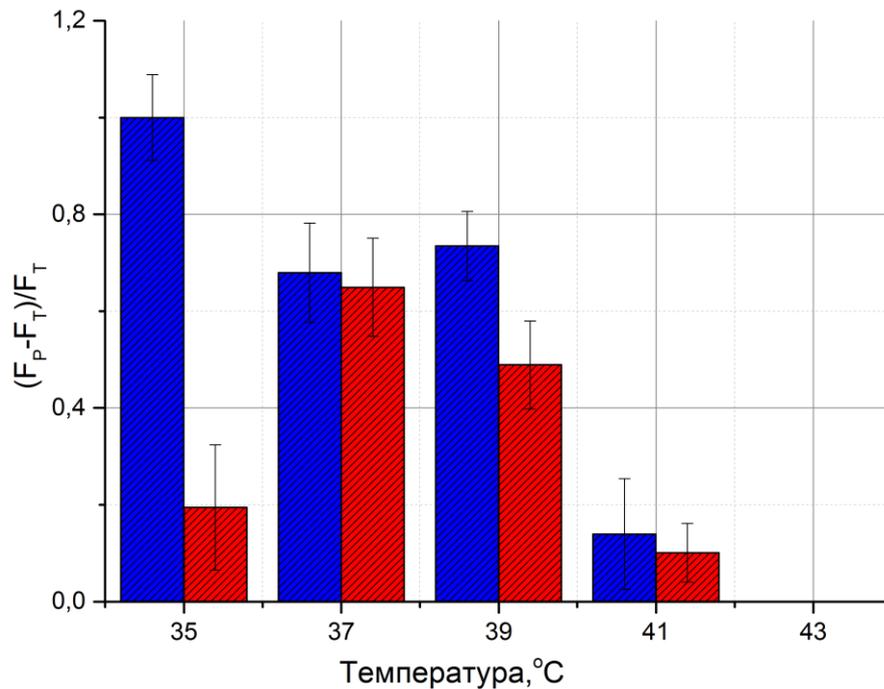


Рис.11. Значения показателя $(F_p - F_t)/F_t$ медленной индукции флуоресценции листьев бобов после теплового воздействия. Левые столбики: после 45 мин прогрева при соответствующей температуре (35–43°C). Правые столбики: после 45 мин прогрева при соответствующей температуре (35–43°C), 30 мин выдерживания в лабораторных условиях и последующего 10-минутного прогрева при 43°C.

При увеличении времени предварительного прогрева до 45 минут при температуре 37°C наблюдалось значение $(F_p - F_t)/F_t$, совпадающее, в пределах погрешности, со значением параметра листьев без воздействия теплового шока, что свидетельствует об эффекте «закаливания» [16, 17, 18, 25].

4.4. Эффект «закаливания» в зависимости от времени релаксации

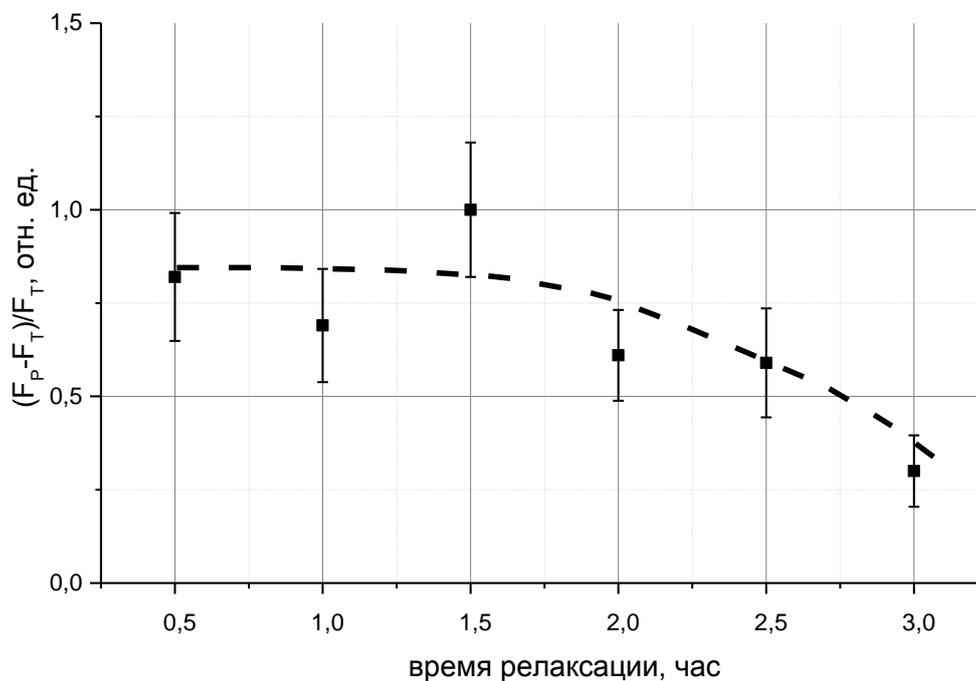


Рис.12. Значения показателя $(F_p - F_t)/F_t$ в зависимости от времени между предварительным прогревом в течение 30 минут при 37°С и последующим нагревом в течение 10 минут при 43°С

Были измерены кривые МИФ с различными временами между 30 минут предварительного закаливания при 37°С и последующего нагрева в течение 10 минут при 43°С. По данным МИФ были рассчитаны значения параметра $(F_p - F_t)/F_t$ в зависимости от времени релаксации (рис.15).

Максимальный эффект закаливания сохраняется в течение от 30 минут до 1,5 часа. Снижение данного эффекта происходит от 2х до 3х часов времени релаксации. Известно, что синтез БТШ начинается уже через 15 мин после воздействия тепловым шоком и длится 6–8 часов [26].

4.5 Измерение коэффициентов фото– и нефотохимического тушения флуоресценции при закаливании

Дополнительно были измерены кривые индукции, а также коэффициенты

нефотокимического и фотокимического тушения флуоресценции после теплового воздействия в течение 45 минут при температуре 37°C, 43°C с предварительным закаливанием 37°C, и 43°C с помощью портативного РАМ-флуориметра (рис.13,14,15).

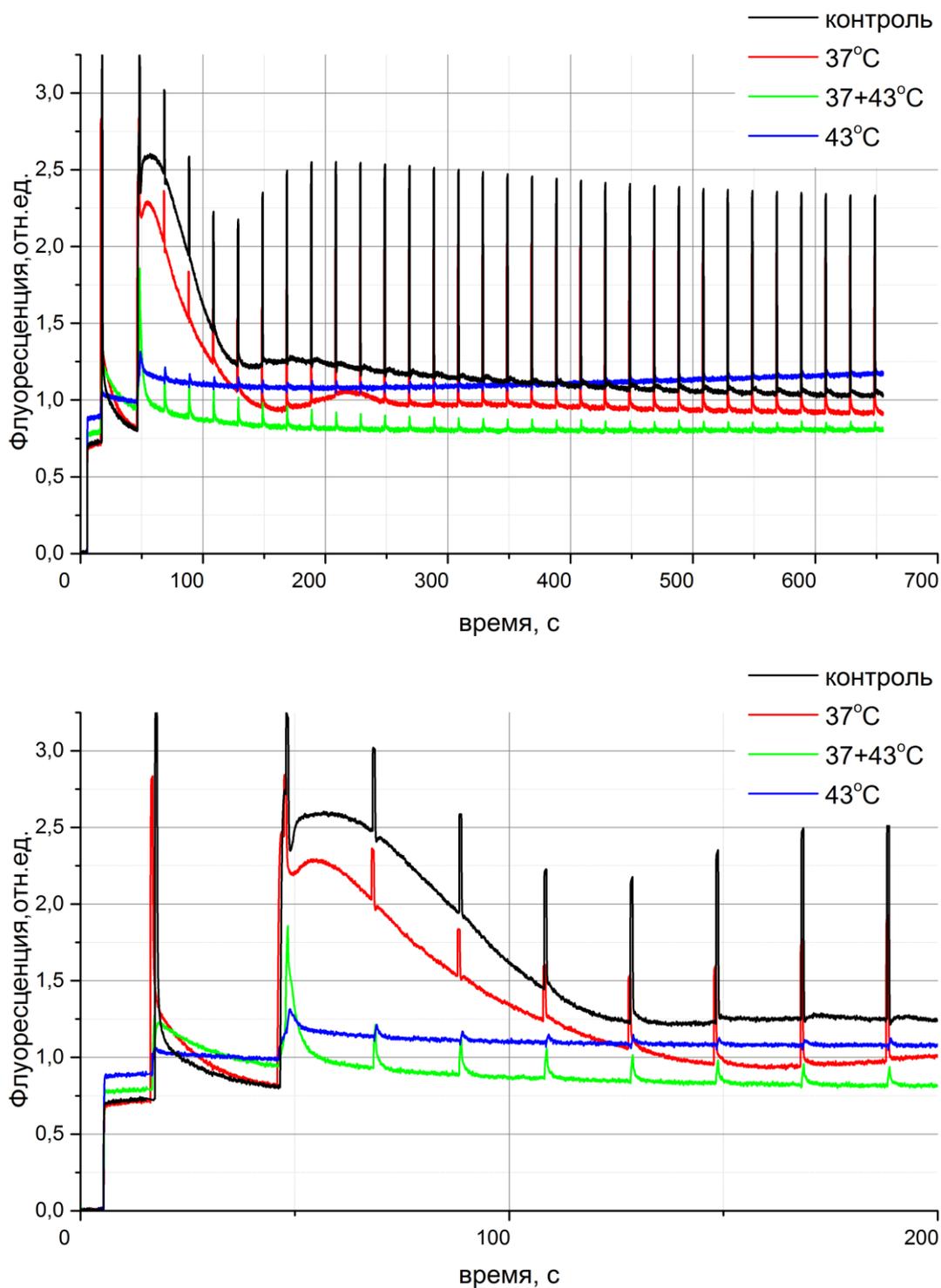


Рис.13. Вид индукционных изменений флуоресценции, полученных с помощью РАМ-флуориметра

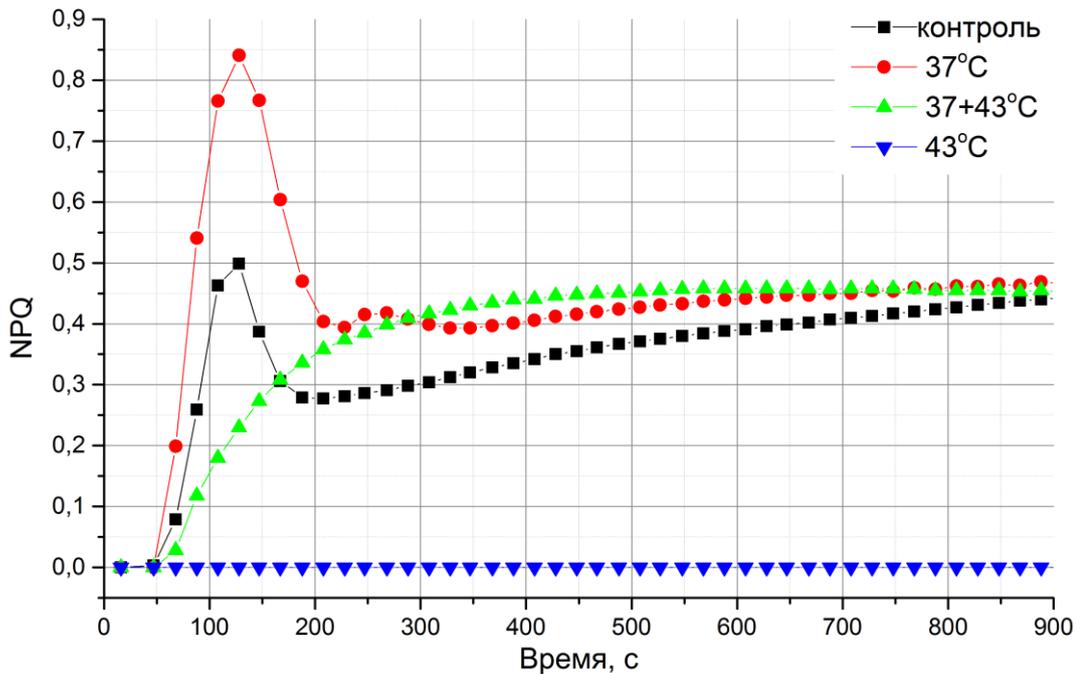


Рис.14. Коэффициенты нефотохимического тушения флуоресценции листьев бобов

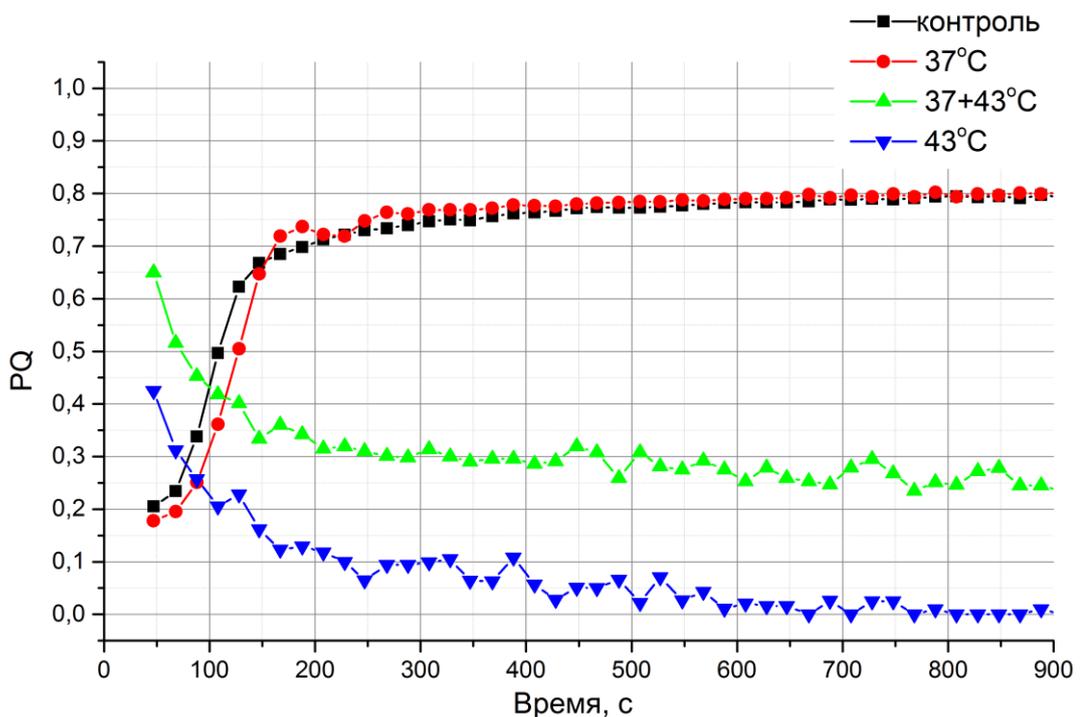


Рис.15. Коэффициенты фотохимического тушения флуоресценции листьев бобов

- Максимальное значение параметра NPQ у растений, прогретых в течение 45 минут при 37°C, на 70% больше, чем в контроле, далее значения выходят на стационарный уровень, который совпадает с контролем.

Зависимость фотохимического тушения полностью совпадает с контролем, а это означает, что окислительно-восстановительное состояние первичных акцепторов электронов ФС2 не изменилось. Увеличение NPQ свидетельствует о том, что большая часть поглощенных квантов света диссипирует в тепло. Это связано с уменьшением сечения поглощения ФС2 из-за перехода части ССК к ФС1, а также из-за структурных изменений белка [21, 27].

- Значения параметра NPQ у растений, нагретых до 43°C с предварительным закаливанием 37°C, монотонно увеличиваются и выходят на стационарный уровень, совпадающий с контрольным. Монотонное увеличение NPQ происходит из-за уменьшения F_m' . При температурном стрессе тушение флуоресценции происходит в основном за счет нефотохимических процессов, что при повреждающих температурах может выражаться в снижении F_m и увеличении F_o относительно контроля. В этом случае происходит нарушение связей между молекулами хлорофилла внутри антенны, а также между антенной и РЦ. Снижение PQ может быть обусловлено увеличением текучести липидов в тилакоидных мембранах, что влияет на организацию и функцию ФС2 [21, 28, 29].

- У растений, нагретых в течение 10 минут при 43°C, параметр NPQ принимает нулевое значение. Это связано с тем, что параметр F_m меньше параметра F_m' . Снижение F_m коррелирует с ингибированием фотосинтетической активности, в основном, из-за повреждения ФС2. Значительное повышение F_o относительно контроля отражает повреждение высокими температурами билипидного слоя тилакоидных мембран. Повышение F_o свидетельствует, как о частичной диссоциации ССК2 от ФС2, существенном уменьшении числа реакционных центров, так и о и большой потере энергии возбуждения при ее переносе к ним. Это также объясняет снижение фотохимического тушения до нуля [21, 29].

5. Результаты и выводы

1. Установлены закономерности в изменении формы кривых МИФ листьев бобов после прогрева в диапазоне температур 24 – 45°C. С увеличением температуры прогрева до 36°C наблюдалось увеличение показателя $(F_M - F_T)/F_T$ МИФ, свидетельствует об увеличении ФА. При температурах выше 40°C показатель $(F_P - F_T)/F_T$ резко снижается, что свидетельствует о нарушениях в функционировании фотосинтетического аппарата растений.

2. Рассчитаны значения $(F_P - F_T)/F_T$ в зависимости от времени между прогревом и регистрацией МИФ. Прогрев листьев при 41°C приводил к частичному восстановлению ФА через 60 минут релаксации. Температура 42°C являлась критической, и восстановление ФА не происходило.

3. Исследован эффект закаливания – повышение устойчивости фотосинтетического аппарата к температуре 43°C после предварительного прогрева при температурах 35 – 43°C в течение 15, 30, 45 минут. Показано, что максимальная эффективность достигалась после предварительного прогрева при 37°C в течение 45 минут.

4. Показано, что эффект закаливания сохраняется в течение 1,5 часа после предварительного прогрева листа. При увеличении времени релаксации эффект закаливания постепенно снижается.

5. Измерены коэффициенты фото – (PQ) и нефотохимического (NPQ) тушения флуоресценции листьев растений, подвергнутых тепловому шоку с предварительным закаливанием и без него. После прогрева при 43°C коэффициенты PQ и NPQ падают до нуля, отражая подавление ФА. Предварительный прогрев при 37°C приводит к частичному восстановлению кинетики изменения этих коэффициентов, что подтверждает эффект закаливания.

В заключение мне хотелось бы выразить глубокую благодарность моему научному руководителю Ирине Павловне Левыкиной за помощь в проведении экспериментов и за постоянное внимание к работе.

Выражаю благодарность доктору физ.-мат. наук, профессору Владимиру Александровичу Караваеву за консультации, за предложенную тему исследования и возможность заниматься ей.

Благодарю всех сотрудников кафедры общей физики за доброжелательное отношение.

6. Обозначения

ССК – светособирающий комплекс;

РЦ – реакционный центр (комплекс молекул хлорофилла, в котором происходит разделение зарядов);

ФС – Фотосистемы (структурно обособленные части фотосинтетического аппарата, отличающиеся по химическому и спектральному составу поглощаемого света, где ФС2 возбуждается коротковолновым светом, а ФС1 – длинноволновым);

БИФ – быстрая индукция флуоресценции;

МИФ – медленная индукция флуоресценции;

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат;

НАДФ⁺ – окисленный НАДФ;

АТФ – аденозинтрифосфат;

АДФ – аденозиндифосфат;

ЭТЦ – электронтранспортная цепь;

Рс – пластоцианин;

Фд – ферредоксин;

ФНР – ферредоксин-НАДФ-редуктаза;

Q_A – первичный акцептор электрона, молекула пластохинона;

Q_B – вторичный акцептор электрона, молекула пластохинола;

QH₂ – пластохинол;

Phe – феофитин;

7. Литература

1. Тихонов А.Н. Трансформация энергии в хлоропластах - энергопреобразующих органеллах растительной клетки // Соросовский образовательный журнал, 1996, №4, с. 24-32.
2. Рубин А.Б., Шинкарёв В.П. Транспорт электронов в биологических системах // М.: Наука, 1984, 320 с.
3. <http://www.eduwiki.uran.net.ua/wiki/images/5/5d/06m1104.jpg>
4. <http://forumimage.ru/uploads/20130205/136008453368506578.jpg>
5. Тихонов А.Н. Регуляция световых и темновых стадий фотосинтеза // Соросовский образовательный журнал, 1999, №11, с. 8-15.
6. Рубин А.Б. Первичные процессы фотосинтеза // Соросовский образовательный журнал, 1997, №10, с. 79-84.
7. Тихонов А.Н. Молекулярные моторы. Часть 1. Вращающиеся моторы живой клетки // Соросовский образовательный журнал, 1999, №6, с. 8-16.
8. Кочубей, С.М., Шевченко, В.В., Бондаренко, О.Ю., Казанцев, Т.А. Изменения кинетики окисления и темнового восстановления реакционных центров фотосистемы I, индуцированные кратковременным прогревом // Физиология и биохимия культурных растений, 2009, т.41. №1.
9. Кулаева О.Н. Белки теплового шока и устойчивость растений к стрессу // Соросовский образовательный журнал, 1997, №2, с.5-13.
10. Гольд В. М., Гаевский Н. А., Голованова Т. И., Белоног Н. П., Горбанева Т. Б. Физиология растений // Красноярск: Сибирский федеральный университет, 2008
11. Лютова М.И., Тихонов Н.А. Последствие высокой температуры на фотосинтез и процессы электронного транспорта в листьях пшеницы // Биофизика, 1983, т.28, №2, с.284-287.
12. Кислюк И.М., Буболо Л.С., Каменцева И.Е., Котлова Е.Р., Шерстнева О.А. Тепловой шок увеличивает терморезистентность

- фотосинтетического транспорта электронов, количество мембран и липидов в хлоропластах листьев пшеницы // Физиология растений. 2007, т.54, с. 517–525.
13. Шевченко В.В. Свет низкой интенсивности защищает фотосистему II от ингибирования при кратковременном прогреве // Физиология и биохимия культ. растений, 2011, т. 43, № 6.
 14. Бондаренко О.Ю. Изменение размеров хлоропластов листьев гороха, индуцированное кратковременным прогревом // Физиология и биохимия культ. растений, 2010, т. 42, № 1.
 15. Кочубей, С.М., Шевченко, В.В., Бондаренко, О.Ю., Казанцев, Т.А. Изменения кинетики окисления и темнового восстановления реакционных центров фотосистемы I, индуцированные кратковременным прогревом // Физиология и биохимия культурных растений, 2009, т.41. №1.
 16. Александров В.Я. Клетки, макромолекулы и температура // Л.: Наука, с. 44-51.
 17. Кошкин Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур // М.: Дрофа, 2010, 640 с.
 18. Нестеренко Т.В., Тихомиров А.А., Шихов В.Н. Индукция флуоресценции хлорофилла и оценка устойчивости растений к неблагоприятным воздействиям // Журнал общей биологии, 2007, т.68, №6, с.444–458.
 19. Georgieva K. Some mechanisms of damage and acclimation of the photosynthetic apparatus due to high temperature // Bulgarian Journal of Plant Physiology, 25 (3-4). 89-99. Aug.1999.
 20. Корнеев Д.Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла // Киев: Альтепресс, 2002, 188 с.
 21. Рубин А.Б. Биофизические методы в экологическом мониторинге // Соросовский образовательный журнал, 2000, т. 6, №4, с. 7-13.

22. Полякова И.Б. Медленная индукция флуоресценции листьев растений при разной фотосинтетической активности // Канд. диссертация, 2002.
23. Бухов Н. Г., Джибладзе Т. Г., Карапетян Н. В. Влияние последействия высоких температур на кинетику переменной и замедленной флуоресценции листьев // Физиология растений. 1987. - Т. 34. - Вып. 3. -с. 435-444.
24. Караваев В.А. Нелинейные регуляторные процессы в фотосинтезе высших растений // Дисс. докт. физ.-мат. наук. М.: МГУ, 1990, 416 с.
25. Кулаева О.Н. Белки теплового шока и устойчивость растений к стрессу // Соросовский образовательный журнал, 1997, №2, с.5-13.
26. Косаковская И.В. Стрессовые белки растений // И.В. Косаковская. - Киев, Институт ботаники им. Холодного, 2008. 150 с.
27. Бухов Н.Г., Джибладзе Т.Г. Влияние повышенных температур на фотосинтетическую активность у интактных листьев ячменя при низких и высоких освещенностях // Физиология растений, 2002, т. 49, с. 371-375.
28. Georgieva K. Some mechanisms of damage and acclimation of the photosynthetic apparatus due to high temperature // Bulgarian Journal of Plant Physiology, 25 (3-4). 89-99. Aug.1999.
29. Рибейро Р.В., Сантос М.Г., Мачадо Е.С., Оливейра Р.Ф. Фотохимическая реакция листьев фасоли на тепловой стресс после предварительного водного дефицита // Физиология растений. 2008. Т.55. №3 , с. 387-396.
30. http://nightart.ru/wp-content/uploads/2010/09/green_lamp_1.jpg