

*ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА»*

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ  
Кафедра Общей физики

**Резниченко Игорь Олегович**

**«Флуоресцентные показатели листьев растений в  
условиях теплового стресса»**

Научный руководитель:  
Проф. Караваев Владимир Александрович

Москва - 2018

# Оглавление

|  |    |
|--|----|
| 1. Введение .....  | 3  |
| 2. Обзор литературы.....   | 4  |
| 2.1. Современные представления о структурно-функциональной организации фотосинтетического аппарата.....                  | 4  |
| 2.1.1. Поглощение света в хлоропластах растений. ....  | 5  |
| 2.1.2. Строение электрон-транспортной цепи в тилакоидах хлоропластов. ....   | 8  |
| 2.1.3. Регуляция темновых и световых стадий фотосинтеза. Фотосинтетический контроль.....                                 | 12 |
| 2.1.4. Перераспределение энергии возбуждения между фотосистемами.  | 14 |
| 2.2. Флуоресцентные методы в изучении фотосинтеза. ....  | 16 |
| 2.2.1. Индукционные изменения флуоресценции фотосинтезирующих объектов. ....   | 16 |
| 2.2.2. Импульсная флуориметрия.....  | 18 |
| 2.3. Изменения в фотосинтетическом аппарате растений при повышенных температурах. ....                                   | 21 |
| 2.4 Белки теплового шока и устойчивость растений к тепловому стрессу, эффект «закаливания». ....                         | 23 |
| 3. Методика измерений.....   | 26 |
| 4. Влияние теплового стресса на флуоресцентные характеристики листьев бобов, выращенных в естественных условиях.....     | 28 |
| 5. Влияние теплового стресса на флуоресцентные характеристики листьев бобов, выращенных при температурах 30 и 35°C. .... | 35 |
| 6. Индукционные изменения флуоресценции листьев бобов после теплового стресса. Эффект закаливания. ....                  | 39 |
| 7. Результаты и выводы. ....   | 43 |
| 8. Литература .....  | 45 |

# 1. Введение

Фотосинтез представляет собой ряд фотофизических и биохимических процессов, в результате которых растения за счет энергии солнечного света синтезируют углеводы (сахара). При освещении растения поглощают из воздуха углекислый газ и выделяют кислород.

Фотосинтетические системы – это высокоорганизованные саморегулирующиеся системы. Важнейшей особенностью работы фотосинтетического аппарата являются высокая эффективность преобразования энергии солнечного света, способность адаптироваться к изменяющимся условиям внешней среды и защищать себя от различных неблагоприятных воздействий. Эффективность фотосинтеза проявляется в различных флуоресцентных характеристиках фотосинтезирующих объектов.

Высокотемпературный стресс представляет собой один из наиболее значимых негативных факторов, влияющих на фотосинтетическую продуктивность высших растений. Тепловое воздействие приводит к дезактивации ключевых ферментов фотосинтеза, повышению текучести мембранных липидов, ингибированию фотофосфорилирования, нарушениям в работе электронно-транспортной цепи хлоропластов и водорасщепляющего комплекса, накоплению активных форм кислорода и обесцвечиванию хлорофилла, а также другим негативным последствиям. Изучение термоустойчивости растений и возможности ее повышения при тех или иных воздействиях является важной и актуальной задачей физиологии растений и биофизики.

Многие растения и бактерии излучают свет в результате различных реакций. Свет, излучаемый этими организмами, представляет большую ценность для биологии, так как он является неинвазивным инструментом для измерения и изучения разнообразных реакций в живой системе.

Цель настоящей работы состоит в изучении индукционных изменений флуоресценции Хл а в листьях бобов после прогрева в достаточно широком диапазоне температур. Для этого было исследовано влияние теплового стресса на флуоресцентные характеристики листьев бобов, выращенных при температурах 25, 30 и 35°C. Также был продемонстрирован эффект закаливания. Для всех образцов были исследованы индукционные изменения флуоресценции хлорофилла, полученные методом импульсной флуориметрии.

## 2. Обзор литературы

### 2.1. Современные представления о структурно-функциональной организации фотосинтетического аппарата.

Фотосинтез представляет собой ряд фотофизических и биохимических процессов, в результате которых растения за счет энергии солнечного света синтезируют углеводы (сахара). При освещении растения поглощают из воздуха углекислый газ и выделяют кислород. Многочисленные стадии фотосинтеза принято разделять на две большие группы процессов – световые и темновые стадии фотосинтеза.

У высших растений процессы фотосинтеза протекают в хлоропластах – энергопреобразующих органеллах растительной клетки. Схематическое изображение хлоропласта показано на рис. 1. Под двойной оболочкой хлоропласта находятся протяженные мембранные структуры, называемые тилакоидами. В мембраны тилакоидов включены макромолекулярные белковые комплексы, в которых происходят световые реакции фотосинтеза. В хлоропластах высших растений тилакоиды группируются в граны, которые представляют собой стопки сплюснутых и тесно прижатых друг к другу тилакоидов, имеющих форму дисков [6].

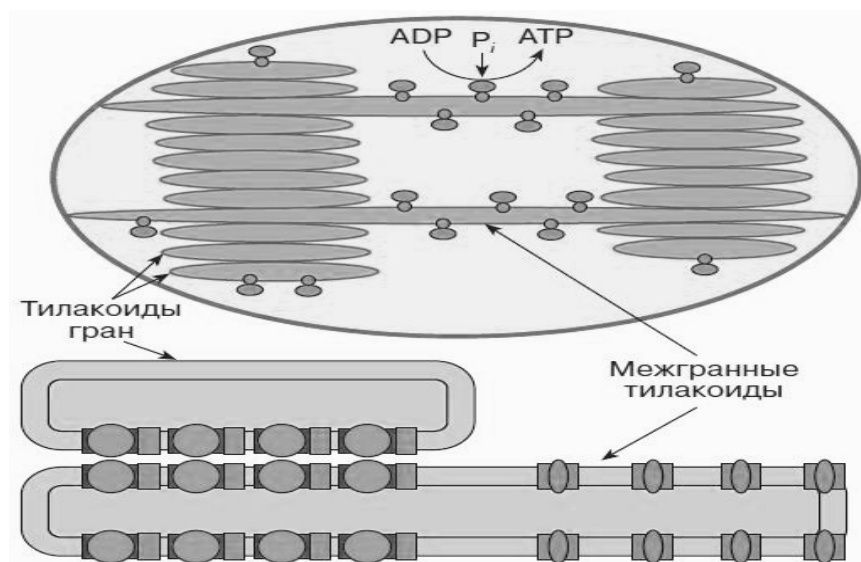


Рис. 1. Схематическое изображение хлоропласта и тилакоидных мембран [4].

Продолжением отдельных тилакоидов гран являются выступающие из них межгранные тилакоиды. Благодаря значительному мембранному пространству достигается увеличение числа функциональных единиц (фотосистем 1 и 2), способных осуществлять световые реакции фотосинтеза. Пространство между оболочкой хлоропласта и тилакоидами называется

стромой. В этой гидрофильной среде содержатся водорастворимые органические соединения, молекулы ДНК, ферменты углеродного цикла фотосинтеза, а также неорганические ионы ( $H^+$ , фосфаты и др.) [3].

### 2.1.1. Поглощение света в хлоропластах растений.

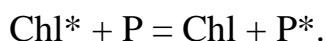
Белковые комплексы, включенные в мембраны тилакоидов и отвечающие за световые процессы фотосинтеза, объединены в две фотосистемы: ФС1 и ФС2. Каждая из фотосистем состоит из светособирающей антенны, фотохимического реакционного центра и связанных с ним молекул переносчиков электрона. Светособирающая антенна представляет собой макромолекулярный комплекс, предназначенный для эффективного улавливания света. В хлоропластах антенный комплекс содержит большое число (до нескольких сотен) молекул хлорофилла и некоторое количество вспомогательных пигментов (каротиноидов), прочно связанных с белком. На ярком солнечном свете отдельная молекула хлорофилла поглощает кванты света в среднем не чаще, чем раз в секунду. На один фотореакционный центр приходится большое количество молекул хлорофилла (200 – 400), что обеспечивает достаточно частое срабатывание реакционного центра даже при относительно слабой интенсивности света [3]. Ансамбль пигментов, поглощающих свет, по сути дела выполняет роль антенны, которая за счет своих достаточно больших размеров эффективно улавливает солнечный свет и направляет его энергию к реакционному центру. Тенелюбивые растения имеют, как правило, больший размер светособирающей антенны по сравнению с растениями, произрастающими в условиях высокой освещенности.

У растений основными светособирающими пигментами служат молекулы хлорофилла а и хлорофилла b, поглощающие свет в синей и красной области спектра. Наряду с хлорофиллом в светособирающую антенну входят вспомогательные пигменты, поглощающие свет в тех областях спектра, в которых сравнительно слабо поглощают свет молекулы хлорофилла. У растений вспомогательными пигментами являются каротиноиды.

Поглощение кванта света молекулой хлорофилла (Chl) или вспомогательного пигмента приводит к ее возбуждению (переход электрона на более высокий энергетический уровень):  $Chl + h\nu = Chl^*$ .

Энергия возбужденной молекулы хлорофилла передается соседним пигментам, которые, в свою очередь, могут передать ее другим молекулам светособирающей антенны:  $Chl^* + Chl = Chl + Chl^*$ .

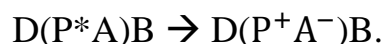
Энергия возбуждения может, таким образом, мигрировать по пигментной матрице до тех пор, пока возбуждение в конечном итоге не попадет на фотореакционный центр Р:



Характерные времена жизни возбужденных состояний молекул хлорофилла и других пигментов очень малы:  $\tau \approx 10^{-10} - 10^{-9}$  с [3,7]. Есть вероятность того, что на пути к реакционному центру Р энергия таких короткоживущих возбужденных состояний пигментов может бесполезно потеряться – диссипировать в тепло или выделиться в виде кванта света (явление флуоресценции). В действительности, однако, эффективность миграции энергии к фотосинтетическому реакционному центру очень велика. В том случае, когда реакционный центр находится в активном состоянии, вероятность потери энергии составляет, как правило, не более 10 – 15 %. Такая высокая эффективность использования энергии солнечного света обусловлена тем, что светособирающая антенна представляет собой высокоупорядоченную структуру, обеспечивающую очень хорошее взаимодействие пигментов друг с другом. Благодаря этому достигается высокая скорость переноса энергии возбуждения от молекул, поглощающих свет, к фотореакционному центру. Среднее время “перескока” энергии возбуждения от одного пигмента к другому, как правило, составляет  $\tau \approx 10^{-12} - 10^{-11}$  с. Общее время миграции возбуждения к реакционному центру обычно не превышает  $10^{-10} - 10^{-9}$  с [3,7].

У растений, водорослей и фотосинтезирующих бактерий реакционные центры являются первичными донорами электрона при фотосинтезе. Фотохимический реакционный центр Р представляет собой особую пару (димер) молекул хлорофилла, который выполняет роль ловушки энергии возбуждения, блуждающего по пигментной матрице светособирающей антенны [6]. К реакционному центру направляется энергия света, поглощаемого всеми пигментами светособирающей антенны. Возбуждение реакционного центра инициирует цепь дальнейших превращений энергии света при фотосинтезе.

Наряду с димером хлорофилла Р в фотосинтетический комплекс входят молекулы первичного и вторичного акцепторов электрона. Обозначим их символами А и В, а также первичный донор электрона – молекула D. Возбужденный реакционный центр Р\* обладает низким сродством к электрону и поэтому он с легкостью отдает его находящемуся рядом с ним первичному акцептору электрона А:



В результате очень быстрого ( $\tau \approx 10^{-12}$  с) переноса электрона от  $P^*$  к  $A$  реализуется второй этап преобразования солнечной энергии при фотосинтезе – разделение зарядов в реакционном центре [3]. При этом образуются сильный восстановитель  $A^-$  (донор электрона) и сильный окислитель  $P^+$  (акцептор электрона). Молекулы  $P^+$  и  $A^-$  расположены в мембране асимметрично: в хлоропластах реакционный центр  $P^+$  находится ближе к поверхности мембраны, обращенной внутрь тилакоида, а акцептор  $A^-$  расположен ближе к внешней стороне [3].

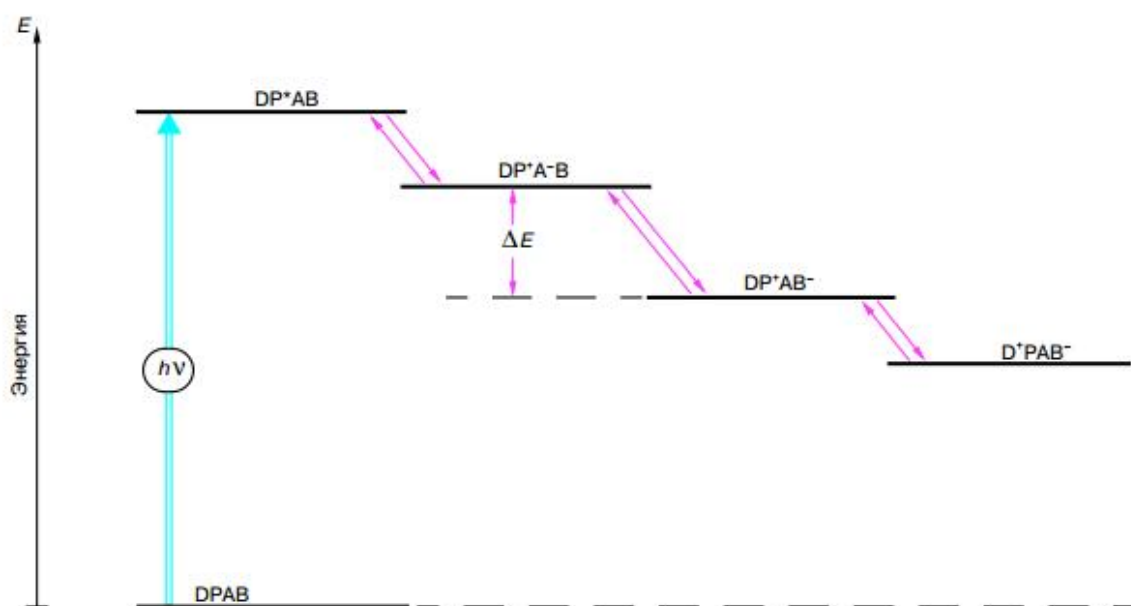


Рис. 2. Схема энергетических уровней реакционного центра [3].

Преобразование энергии в реакционных центрах обладает высокой эффективностью. Электрон, перенесенный на акцептор  $A$ , не возвращается обратно к положительно заряженному окисленному центру  $P^+$ . Стабилизация разделенных зарядов обеспечивается главным образом за счет вторичных процессов электронного транспорта, следующих за переносом электрона от  $P^*$  к  $A$ . От восстановленного первичного акцептора  $A^-$  электрон очень быстро (характерное время этого процесса обычно не превосходит  $10^{-10}$  –  $10^{-9}$  с) уходит на вторичный акцептор электрона  $B$  [3,7]:



При этом происходит не только удаление электрона от положительно заряженного реакционного центра  $P^+$ , но и заметно снижается энергия всей системы. Это означает, что для переноса электрона в обратном направлении (переход  $B^- \rightarrow A$ ) ему потребуется преодолеть достаточно высокий

энергетический барьер  $\Delta E \approx 0,3 - 0,4$  эВ, где  $\Delta E$  – разность энергетических уровней для двух состояний системы, при которых электрон находится на переносчике А или В [6]. По этой причине для возвращения электрона назад, от восстановленной молекулы  $V^-$  к окисленной молекуле А, ему потребовалось бы гораздо больше времени, чем для прямого перехода  $A^- \rightarrow V$ . Поэтому после переноса электрона на вторичный акцептор В существенно уменьшается вероятность его возвращения назад и рекомбинации с положительно заряженной “дыркой”  $P^+$ .

Вторым фактором, способствующим стабилизации разделенных зарядов, служит быстрая нейтрализация окисленного фотореакционного центра  $P^+$  за счет электрона, поступающего к  $P^+$  от донора электрона D [3]:



Получив электрон от молекулы донора D и вернувшись в свое исходное восстановленное состояние P, реакционный центр уже не будет в состоянии принять электрон от восстановленных акцепторов, однако теперь он готов к повторному срабатыванию – отдать электрон находящемуся рядом с ним окисленному первичному акцептору А.

### **2.1.2. Строение электрон-транспортной цепи в тилакоидах хлоропластов.**

В хлоропластах высших растений имеются две фотосистемы – фотосистема 1 (ФС1) и фотосистема 2 (ФС2), различающиеся по составу белков, пигментов и оптическим свойствам. Светособирающая антенна ФС1 поглощает свет с длиной волны  $\lambda = 700 - 730$  нм, а ФС2 – свет с  $\lambda < 680 - 700$  нм. Индуцированное светом окисление реакционных центров ФС1 и ФС2 сопровождается их обесцвечиванием, которое характеризуется изменениями их спектров поглощения при  $\lambda \approx 700$  и 680 нм [3,6,7]. В соответствии с их оптическими характеристиками реакционные центры ФС1 и ФС2 получили название P700 и P680.

Две фотосистемы связаны между собой посредством цепи электронных переносчиков. ФС2 является источником электронов для ФС1. Иницируемое светом разделение зарядов в фотореакционных центрах P700 и P680 обеспечивает перенос электрона от воды, разлагаемой в ФС2, к конечному акцептору электрона – молекуле  $NADP^+$ .

Цепь электронного транспорта (ЦЭТ), соединяющая две фотосистемы, в качестве переносчиков электрона включает в себя молекулы пластохинона,



отдельный электрон-транспортный белковый комплекс (b/f-комплекс) и водорастворимый белок пластоцианин P.

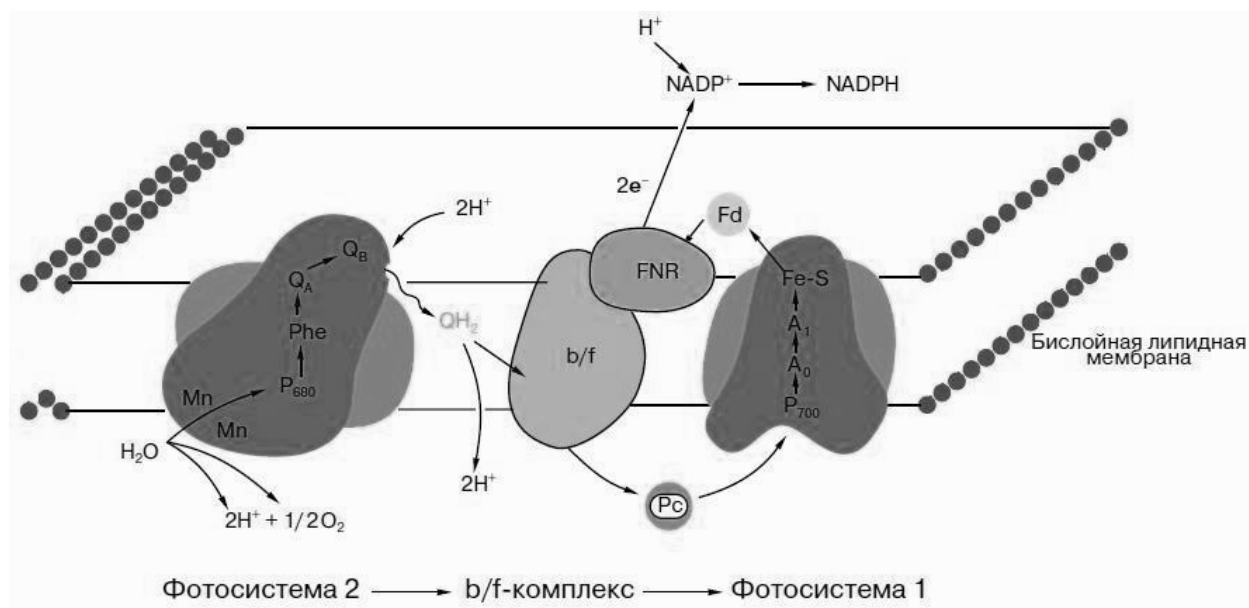
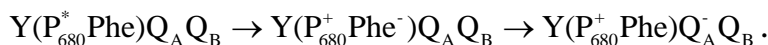
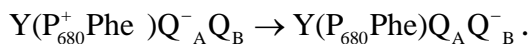


Рис. 3. Схема электрон-транспортной цепи [3].

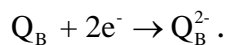
В ФС2 от возбужденного центра электрон переносится сначала на первичный акцептор феофитин (Phe), а затем на молекулу пластохинона  $Q_A$ , прочно связанную с одним из белков ФС2 [3,6]:



Затем электрон переносится на вторую молекулу пластохинона  $Q_B$ , а получает электрон от первичного донора электрона Y:



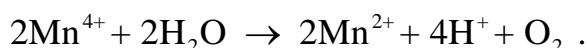
Молекула пластохинона способна принять два электрона. После двукратного срабатывания реакционного центра ФС2 молекула пластохинона  $Q_B$  получит два электрона:



Отрицательно заряженная молекула  $Q_B^{2-}$  обладает высоким сродством к ионам водорода, которые она захватывает из стромального пространства. После протонирования восстановленного пластохинона ( $Q_B^{2-} + 2H^+ \rightarrow QH_2$ ) образуется электрически нейтральная форма этой молекулы  $QH_2$ . Пластохинон  $QH_2$  выполняет роль подвижного переносчика: покинув ФС2, молекула  $QH_2$  может легко перемещаться внутри тилакоидной мембраны, обеспечивая связь ФС2 с другими электронтранспортными комплексами.

Окисленный реакционный центр ФС2 обладает исключительно высоким сродством к электрону, то есть является очень сильным окислителем. Благодаря этому в ФС2 происходит разложение воды – химически устойчивого соединения. Входящий в состав ФС2 водорасщепляющий

комплекс (ВРК) содержит в своем активном центре группу ионов марганца ( $Mn^{2+}$ ), которые служат донорами электрона для Р680. Отдавая электроны окисленному реакционному центру, ионы марганца становятся “накопителями” положительных зарядов, которые непосредственно участвуют в реакции окисления воды. В результате последовательного четырехкратного срабатывания реакционного центра Р680 в Mn-содержащем активном центре ВРК накапливаются четыре сильных окислительных эквивалента (или четыре “дырки”) в форме окисленных ионов марганца ( $Mn^{4+}$ ), которые, взаимодействуя с двумя молекулами воды, катализируют реакцию разложения воды:



Таким образом, после последовательной передачи четырех электронов от ВРК к Р680 происходит синхронное разложение сразу двух молекул воды, сопровождающееся выделением одной молекулы кислорода и четырех ионов водорода, которые попадают во внутритилакоидное пространство хлоропласта [3,6].

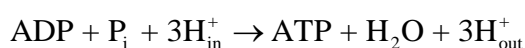
Образовавшаяся при функционировании ФС2 молекула пластохинола  $QH_2$  диффундирует внутри липидного бислоя тилакоидной мембраны к b/f-комплексу. При столкновении с b/f-комплексом молекула  $QH_2$  связывается с ним, а затем передает ему два электрона. При этом на каждую молекулу пластохинола, окисляемую b/f-комплексом, внутрь тилакоида выделяются два иона водорода. В свою очередь, b/f-комплекс служит донором электрона для пластоцианина (Pc) – небольшого водорастворимого белка, у которого в состав активного центра входит ион меди (реакции восстановления и окисления пластоцианина сопровождаются изменениями валентности иона меди  $Cu^{2+} + e^- \leftrightarrow Cu^+$ ) [3]. Пластоцианин выполняет роль связующего звена между b/f-комплексом и ФС1. Молекула пластоцианина быстро перемещается внутри тилакоида, обеспечивая перенос электрона от b/f-комплекса к ФС1. От восстановленного пластоцианина электрон поступает непосредственно к окисленным реакционным центрам ФС1. Таким образом, в результате совместного действия ФС1 и ФС2 два электрона от молекулы воды, разлагаемой в ФС2, через цепь электронного транспорта переносятся в конечном итоге на молекулу  $NADP^+$ , обеспечивая образование сильного восстановителя  $NADPH$  [3,6].

Причина происхождения двух фотосистем заключается в том, что энергии одного кванта видимого света недостаточно для того, чтобы обеспечить разложение воды и эффективное прохождение электроном всего пути по цепи

молекул-переносчиков от воды к NADP<sup>+</sup>. Появление в ходе эволюции ФС2 в единой цепи переноса электрона вместе с ФС1 решило энергетическую проблему преодоления большой разницы в окислительно-восстановительных потенциалах пар кислород/вода и NADP<sup>+</sup>/NADPH. Водоросли и зеленые растения, “научившись” окислять воду, овладели неисчерпаемым источником электронов для восстановления NADP<sup>+</sup>. Разлагая воду, они наполнили атмосферу Земли молекулярным кислородом, создав условия для бурного эволюционного развития организмов, энергетика которых связана с аэробным дыханием [3].

Перенос электрона по ЦЭТ, как правило, сопровождается понижением энергии. Однако перенос электрона не является энергетически бесполезным процессом. В нормальных условиях функционирования хлоропластов большая часть энергии, выделяющейся в ходе электронного транспорта, не пропадает бесполезно, а используется для работы специального энергопреобразующего комплекса, называемого АТФ-синтазой. Этот комплекс катализирует энергетически невыгодный процесс образования АТФ из ADP и неорганического фосфата P<sub>i</sub> (реакция ADP + P<sub>i</sub> → АТФ + Н<sub>2</sub>О) [6]. Поэтому энергодонорные процессы электронного транспорта сопряжены с энергоакцепторными процессами синтеза АТФ.

Важнейшую роль в обеспечении энергетического сопряжения в мембранах тилакоидов играют процессы протонного транспорта. Синтез АТФ тесно связан с переносом через АТФ-синтазу трех протонов из тилакоидов (3H<sub>in</sub><sup>+</sup>) в строму (3H<sub>out</sub><sup>+</sup>):



Этот процесс становится возможным вследствие асимметричного расположения переносчиков в мембране. В ходе электронного переноса происходит накопление избыточного количества протонов внутри тилакоида. Ионы водорода поглощаются снаружи на стадиях восстановления NADP<sup>+</sup> и образования пластохинола и выделяются внутри тилакоидов на стадиях разложения воды и окисления пластохинола. Освещение хлоропластов приводит к существенному (в 100 – 1000 раз) увеличению концентрации ионов водорода внутри тилакоидов [6].

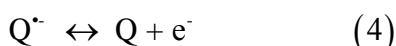
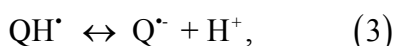
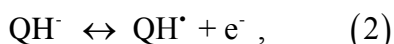
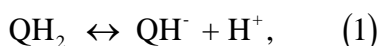
### 2.1.3. Регуляция темновых и световых стадий фотосинтеза. Фотосинтетический контроль.

Важнейшей особенностью работы фотосинтетического аппарата является высокая эффективность преобразования энергии солнечного света, умение фотосинтетических систем адаптироваться к изменяющимся условиям внешней среды и защищать себя от различных неблагоприятных воздействий. Регуляция фотосинтеза, как и подавляющего большинства других процессов в природе, осуществляется по принципу обратной связи. Скорость регулируемого процесса зависит от результата этого процесса. Как правило, в сложной системе регулируемым процессом является стадия, которая ограничивает скорость работы всей системы. Например, скорость химической реакции может контролироваться концентрацией конечного или какого-либо промежуточного продукта, образующегося в ходе реакции. Если этот продукт является ингибитором одной из ключевых стадий химического процесса, то накопление данного продукта будет замедлять общую скорость реакции.

Хорошо известным регуляторным явлением является фотосинтетический контроль в хлоропластах. Он состоит в том, что скорость переноса электронов в фотосинтетической цепи электронного транспорта хлоропластов зависит от соотношения между количеством субстратов и продуктов реакции синтеза АТФ ( $ADP + P_i \rightarrow ATP + H_2O$ ). При избытке субстратов этой реакции ( $ADP$  и  $P_i$ ) скорости переноса электронов поддерживаются на максимальных уровнях. В этих условиях идет интенсивный синтез молекул АТФ (хлоропласты находятся в метаболическом состоянии 3). После того как наступает истощение молекул  $ADP$  и появляется избыток АТФ, скорость электронного транспорта замедляется. Торможение электронного транспорта, обусловленное образованием избыточного количества конечного продукта (АТФ), связывают с переходом хлоропластов в состояние фотосинтетического контроля (метаболическое состояние 4). Ключевую роль в явлениях фотосинтетического контроля играют процессы протонного транспорта, сопряженного с реакциями синтеза АТФ [4].

Работа фотосинтетической цепи электронного транспорта приводит к накоплению ионов водорода внутри тилакоидов и, следовательно, к уменьшению внутритилакоидного рН. Специальные измерения показали, что значение рН внутритилакоидного пространства ( $pH_{in}$ ) при освещении хлоропластов может понижаться на 2,5–3 единицы рН [4]. Закисление внутритилакоидного пространства вызывает торможение электронного транспорта. Это происходит на самом медленном участке в цепи переноса

электронов от воды к  $\text{NADP}^+$  – на стадии окисления пластохинола. Скорость окисления пластохинола зависит от концентрации ионов водорода внутри тилакоидов: чем выше их концентрация (ниже значение  $\text{pH}_{\text{in}}$ ), тем медленнее происходит окисление  $\text{QH}_2$ . Связано это с тем, что переносу электронов от пластохинола ( $\text{QH}_2$ ) и его полувосстановленной формы пластосемихинона ( $\text{QH}^\bullet$ ) к b/f-комплексу (реакции (2) и (4)) предшествуют стадии диссоциации протона во внутритилакоидный объем (реакции (1) и (3)):



Заряженные формы пластохинола ( $\text{QH}^-$ ) и пластосемихинона ( $\text{Q}^\bullet$ ) являются непосредственными донорами электрона для b/f-комплекса [3,4]. Реакции диссоциации (1) и (3), в ходе которых образуются активные формы восстановленного пластохинона  $\text{QH}^-$  и  $\text{Q}^\bullet$ , зависят от pH внутри тилакоидов. По мере увеличения концентрации ионов водорода во внутритилакоидном пространстве вероятность диссоциации протона уменьшается, так как в этом случае за счет повышенного давления протонов равновесие в реакциях (1) и (3) сдвигается влево, то есть в сторону образования неактивных протонированных форм пластохинола ( $\text{QH}_2$ ) и пластосемихинона ( $\text{QH}^\bullet$ ) [4]. Именно поэтому накопление ионов водорода внутри тилакоидов вызывает замедление скорости электронного транспорта.

Молекулы ADP и ATP сами непосредственно не взаимодействуют с цепью электронного транспорта [4,6]. Они влияют на выход протонов из тилакоидов наружу через ATP-синтазный комплекс. Реакции синтеза ATP сопряжены с переносом протонов через ATP-синтазу. При избытке молекул ADP скорость работы ATP-синтазного комплекса велика. Это значит, что наряду с поступлением протонов внутрь тилакоидов происходит их интенсивный выход наружу через ATP-синтазу. Поэтому в условиях синтеза ATP не происходит столь сильного закисления внутритилакоидного пространства, которое могло бы вызвать торможение электронного транспорта. После истощения запаса молекул ADP синтез ATP практически останавливается, а вместе с этим резко снижается скорость выхода протонов наружу. При этом, однако, цепь переноса электронов работает, поэтому протоны продолжают поступать внутрь тилакоидов. Поскольку при отсутствии ADP канал быстрого выхода протонов наружу через ATP синтазу практически закрыт, то после истощения ADP концентрация протонов внутри тилакоидов увеличится и соответственно значение внутритилакоидного pH ( $\text{pH}_{\text{in}}$ ) дополнительно

понижится. Уменьшение  $pH_{in}$  замедляет окисление пластохинола и тем самым тормозит перенос электронов между ФС2 и ФС1.

Таким образом, в условиях, когда в хлоропластах имеется избыток субстратов фосфорилирования (ADP и  $P_i$ ), скорость электронного транспорта поддерживается на высоком уровне и соответственно при этом велика скорость синтеза АТФ (состояние 3). В то же время если потребность в синтезе АТФ мала (в хлоропластах имеется избыток АТФ), то работа цепи электронного транспорта замедляется (состояние 4). После того как запасы АТФ в хлоропластах будут исчерпаны (например, за счет гидролиза АТФ в реакциях цикла Кальвина) и появится избыток молекул ADP, включатся в работу АТФ-синтазные комплексы, в результате чего уменьшится концентрация ионов водорода внутри тилакоидов и снова возрастет скорость электронного транспорта [4].

#### **2.1.4. Перераспределение энергии возбуждения между фотосистемами.**

В 1977 году Дж. Беннет обнаружил, что после освещения хлоропластов в присутствии АТФ фосфорилируется один из полипептидов, входящих в состав так называемого лабильного светособирающего комплекса хлоропластов [3,7]. Впоследствии было установлено, что это явление может иметь непосредственное отношение к регуляции распределения энергии света между ФС1 и ФС2. В хлоропластах для согласования совместной работы двух фотосистем должен существовать механизм, обеспечивающий оптимальное распределение энергии поглощаемого света между светособирающими антеннами комплексов ФС1 и ФС2. Необходимость существования такого механизма очевидна. Действительно, если, например, светособирающая антенна ФС2 получает существенный избыток квантов света по сравнению с ФС1, то эффективность использования энергии света в ФС2 будет невелика. В этом случае за счет более частого срабатывания реакционных центров ФС2 на участке цепи электронного транспорта между ФС2 и ФС1 накопится избыток восстановленных переносчиков, которые не будут успевать окисляться редко работающими реакционными центрами ФС1. Этого можно избежать, если изменить соотношение между размерами светособирающих антенн ФС1 и ФС2, увеличив размер антенны ФС1 за счет уменьшения антенны ФС2.

Для регуляции распределения света в хлоропластах наряду с основными светособирающими пигментными комплексами, жестко связанными с ФС1 и ФС2, имеется лабильный (подвижный) светособирающий комплекс 2 (сокращенно ССК2). Этот комплекс выполняет роль дополнительной антенны,

предназначенной для усиления светосбора одной из фотосистем [4,6,7]. В хлоропластах комплексы ФС1 и ФС2 находятся в мембранах тилакоидов гран и межгранных тилакоидов. Однако распределены они между этими тилакоидами неравномерно. Основная часть комплексов ФС1 локализована в межгранных тилакоидах, в то время как большинство комплексов ФС2 находится в тилакоидах гран [3]. Предполагается, что в условиях низкой освещенности ССК2 располагаются в основном в тилакоидах гран рядом с ФС2, благодаря чему общий размер светособирающей антенны ФС2 увеличен. Однако в определенных условиях, когда возникает необходимость увеличить эффективность работы ФС1, этот лабильный светособирающий комплекс покидает ФС2 и, перемещаясь в плоскости мембраны в сторону межгранных тилакоидов, стыкуется с ФС1. Сигналом для срабатывания механизма, вызывающего перемещение ССК2, служит образование избытка восстановленных переносчиков в цепи электронного транспорта между фотосистемами [4]. Такой избыток может возникать, например, при более частом срабатывании реакционных центров ФС2 по сравнению с ФС1. Перемещение ССК2 к ФС1 помогает хлоропластам разгрузить цепь переноса электронов между фотосистемами за счет более частого срабатывания ФС1.

Механизм перераспределения ССК2 между светособирающими антеннами ФС2 и ФС1 связан с фосфорилированием одной из субъединиц этого комплекса. Переполнение цепи электронного транспорта служит сигналом для включения в работу протеинкиназы – фермента, катализирующего перенос фосфата с молекулы АТФ на ССК2 [4]. В результате такой модификации ССК2 теряет связь с ФС2. Предполагается, что фосфорилированный комплекс выталкивается из тилакоидов гран, где сосредоточена большая часть ФС2, и перемещается в межгранные тилакоиды, обогащенные комплексами ФС1. Силы, вытесняющие фосфорилированные комплексы ССК2 из гран, имеют электростатическую природу [6]. После присоединения к ССК2 отрицательно заряженного фосфата им становится энергетически невыгодно находиться вблизи друг от друга в тилакоидах гран, которые тесно примыкают друг к другу. Поэтому фосфорилированные комплексы ССК2 перемещаются в межгранные тилакоиды, которые пространственно разнесены. В результате такой структурной реорганизации размеры светособирающей антенны ФС2 уменьшаются, а ФС1 увеличиваются. Этим достигается оптимальное распределение поглощаемой энергии света между фотосистемами, когда скорость поступления электронов от ФС2 оказывается согласованной с частотой срабатывания реакционных центров ФС1.

## 2.2. Флуоресцентные методы в изучении фотосинтеза.

Источником флуоресценции в растительной клетке являются светособирающие молекулы пигментов, причём подавляющая часть флуоресценции в нормальных условиях происходит от хлорофилла а (Хл а) ФС2 [3,6,7].

Квантовый выход флуоресценции (отношение числа испущенных квантов к числу поглощённых) равен [2]:

$$qF = \frac{k_F}{k_F + k_P + k_D + k_T}$$

где  $k_F$  – константа скорости флуоресценции;

$k_P$  – константа фотохимической реакции;

$k_D$  – константа тепловой дезактивации;

$k_T$  – константа переноса энергии возбуждения к нефлуоресцирующим пигментам.

Квантовый выход флуоресценции хлорофилла а в листе составляет около 2-8% со средним временем жизни около 300 пс (для “открытых” РЦ) и около 1,6 нс (для “закрытых” РЦ). Вклад ФС1 в сигнал флуоресценции при комнатной температуре < 20% [3,6,7].

### 2.2.1. Индукционные изменения флуоресценции фотосинтезирующих объектов.

При освещении зелёного листа после периода темновой адаптации, интенсивность флуоресценции, как правило, претерпевает ряд немонотонных изменений (эффект Каутского [7,12]).

Изменения O-I-D-P называют первой волной, или быстрой индукцией флуоресценции (БИФ). Она протекает за 1-3 с в зависимости от интенсивности света и других факторов. Более медленные изменения P-S-M-T известны как вторая волна, или медленная индукция флуоресценции (МИФ). Эти изменения протекают за времена от нескольких десятков секунд, до нескольких минут в зависимости от объекта и условий эксперимента. Большую роль в интерпретации БИФ сыграла гипотеза Дюйзенса и Свирса [2,9], в которой флуоресценция и первичные реакции фотосинтеза рассматриваются как конкурирующие процессы. В соответствии с этой гипотезой индукционные изменения флуоресценции связаны с изменением окислительно-восстановительного состояния первичного акцептора электронов ФС2 пластохинона Q.



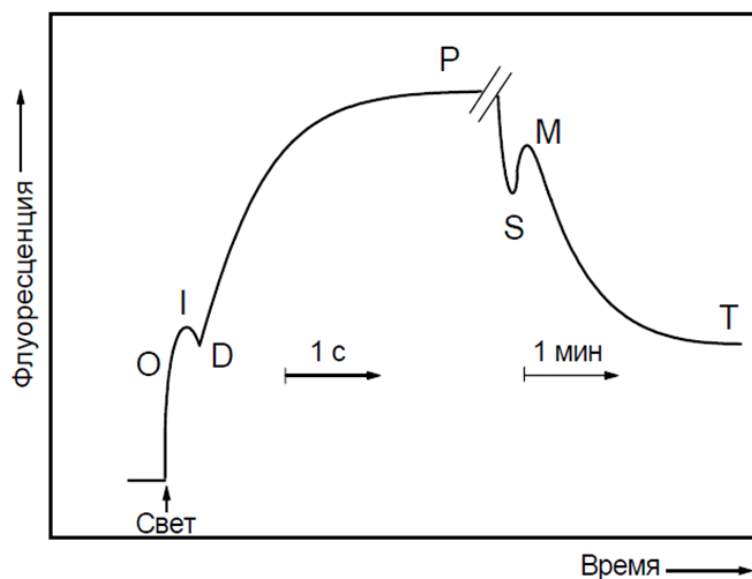


Рис. 4. Схема индукционных изменений флуоресценции зелёного листа [19].

Однозначная интерпретация МИФ в литературе отсутствует. Согласно одной из гипотез [7], 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<sup>+</sup>-редуктаза: уже через несколько секунд освещения он приобретает способность «оттягивать» через цепи переноса электроны от первичного акцептора Q, и флуоресценция хлорофилла уменьшается. Тушение флуоресценции на этой стадии частично связано с образованием градиента протонов  $\Delta pH$  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 [7].

Таким образом, можно констатировать, что МИФ фотосинтезирующих объектов является отражением системы регуляторных механизмов фотосинтеза. Тушение флуоресценции подразделяют на фотохимическое (Qp) и нефотохимическое (Qn) [2,9].

Фотохимическое тушение  $Q_p$  зависит от окислительно-восстановительного состояния первичных акцепторов (Q) электронов ФС2. В адаптированных к темноте хлоропластах Q находится в окисленном состоянии и способен принимать электроны от хлорофилла а ФС2, гася таким образом флуоресценцию в силу электронного потока от  $H_2O$  к Q [2,9].

Нефотохимическое тушение, в свою очередь, обычно разделяют на 3 компонента:

1. Энергетическое тушение ( $q_E$ ), зависящее от величины  $\Delta pH$  на тилакоидной мембране.
2. Тушение, относящееся к переходу “состояние 1” – “состояние 2” ( $q_T$ ), вследствие фосфорилирования белков ССК2 и перераспределения энергии возбуждения в пользу ФС1.
3. Тушение, связанное с фотоингибированием фотосинтеза ( $q_I$ ) (усиление безызлучательной диссипации энергии при повышенной освещённости) .

Вклад каждого механизма в суммарную величину  $Q_p$  зависит от интенсивности света. Тушение  $q_T$  преобладает при низком, а  $q_E$  и  $q_I$  – при высоком освещении [5].

### 2.2.2. Импульсная флуориметрия.

Измерительная система РАМ-флуориметра селективно регистрирует выход флуоресценции на частоте следования микросекундных импульсов.

$F_0$  – выход флуоресценции хлорофилла под действием модулированного возбуждающего света низкой интенсивности;  
 $F_m$  – максимальный выход флуоресценции адаптированного к темноте листа, индуцированный насыщающим импульсом света;  
 $F_m'$  – максимальный выход флуоресценции, индуцированный насыщающим импульсом 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 акцептора  $Q_A$  готовы принять электрон от Р680. 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 ( $F_m$ ) [5]. 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  $F_0$ .

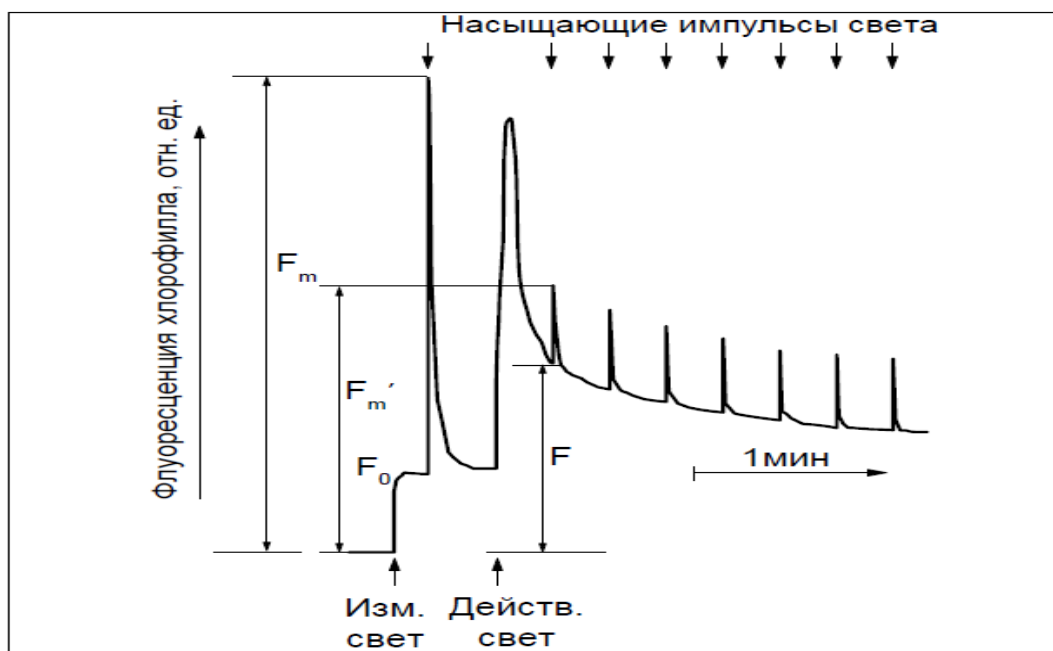


Рис. 5. Протокол измерений флуоресценции с помощью импульсного флуориметра. [1]

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» [6].

Коэффициенты тушения обычно рассчитывают, исходя из уменьшения так называемой переменной флуоресценции:

$$q = \frac{F_v - F'_v}{F_v}$$

где  $F_v$  – максимальная переменная флуоресценция в соответствующий момент времени, а  $F'_v$  – переменная флуоресценция в “состоянии тушения”. Так, для нефотохимического тушения:

$$q_N = \frac{(F_m - F_0) - (F_m' - F_0')}{F_m - F_0} = 1 - \frac{F_m' - F_0'}{F_m - F_0}$$

Для фотохимического тушения соответственно получим:

$$q_P = \frac{(F_m' - F_0') - (F - F_0')}{F_m' - F_0'} = \frac{F_m' - F}{F_m' - F_0'}$$

Параметр  $F_v/F_m$  характеризует эффективность работы фотосистемы 2 [2].

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_0}{F_m}$$

### **2.3. Изменения в фотосинтетическом аппарате растений при повышенных температурах.**

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°C, а максимум фотосинтеза для них лежит в области 20 – 30°C. Спад фотосинтеза с повышением температуры от 35 – 40°C связан с уменьшением активности реакционного центра ФС2 [14,17]. Известно, что прогрев до температур примерно 45°C блокирует нециклический транспорт электронов [14,17,18]. Полностью РЦ ФС2 перестают функционировать как ловушки при температуре 50°C. При 55°C нарушается передача энергии возбуждения от хлорофилла b к хлорофиллу a. При температурах выше 60 – 65°C перестает 10 функционировать ФС1 [14,17].

Тепловое воздействие приводит к дезактивации ключевых ферментов фотосинтеза, ингибированию фотофосфорилирования, нарушениям в работе электронно-транспортной цепи хлоропластов и водорасщепляющего комплекса, накоплению активных форм кислорода и обесцвечиванию хлорофилла [16,17,18].

В области температур немного выше оптимальных снижение интенсивности фотосинтеза объясняют снижением тургора в листьях и закрыванием устьиц, что затрудняет поступление CO<sub>2</sub> к центрам его фиксации. При повышении температуры снижается растворимость CO<sub>2</sub>, увеличивается степень кислородного ингибирования, увеличивается текучесть липидов в тилакоидных мембранах [14, 16]. Под влиянием высокой температуры в мембранах увеличивается количество ненасыщенных фосфолипидов. При этом водородные и электростатические взаимодействия между полярными группами белков внутри жидкой фазы мембраны падают, а интегральные белки сильнее взаимодействуют с липидной фазой. В результате состав и структура мембраны изменяются, и как следствие, происходит увеличение проницаемости мембран и выделение из клетки водорастворимых веществ. Повышенная текучесть мембранных липидов при высокой температуре может сопровождаться потерей активности связанных с мембранами ферментов и нарушением работы переносчиков электронов. [14]

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 [16].

Тормозится фотосинтез, как световая фаза, так и фиксация углекислоты. Наиболее чувствителен к высокой температуре транспорт электронов в фотосистеме II. Однако денатурация отдельных ферментов фотосинтеза происходит при более высокой температуре, чем ингибирование фотосинтеза, т.е. наиболее ранние стадии повреждения фотосинтеза скорее связаны с изменениями в составе мембран и с нарушением энергозависимых процессов в хлоропластах, чем с разрушением ферментов. [14]

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 [14].

## 2.4 Белки теплового шока и устойчивость растений к тепловому стрессу, эффект «закаливания».

Одно из общих свойств клеток всех типов живых организмов состоит в том, что в ответ на увеличение температуры они включают синтез специфического набора белков, называемых белками теплового шока (БТШ), которые помогают клетке выжить в условиях температурного стресса и вернуться после его прекращения к нормальной жизни. БТШ у всех организмов представлены большим набором полипептидов, и их принято именовать в соответствии с молекулярной массой, выраженной в килодальтонах (кД). Например, БТШ с молекулярной массой 70 кД называют БТШ70. О существенной роли БТШ в жизни клеток говорит их высокая консервативность в эволюции. Например, БТШ70 имеет высокое сходство аминокислотной последовательности у насекомых, птиц, млекопитающих, грибов и растений. Отдельные участки в БТШ70 сохраняют свыше 90% гомологии у бактерий и человека [5].

БТШ у растений являются одним из компонентов программ, вызываемых (индуцируемых) стрессом и необходимых для выживания клеток в стрессовых условиях. Как и у других организмов, БТШ растений множественны. Они представлены группой высокомолекулярных (110–60 кД) и низкомолекулярных (35–15 кД) белков. Отличительными чертами растений являются множественность низкомолекулярных БТШ и высокая интенсивность их синтеза при ТШ [5,15].

Синтез БТШ – стрессовая программа, включаемая тепловым шоком. Он происходит при подъеме температуры на 8–10°C выше нормальной. Например, у широко применяемого в генетических и физиологических исследованиях растения арабидопсис (резушка Таля – *Arabidopsis thaliana*), с малым размером генома, синтез БТШ происходит при температуре 28–37°C, в листьях ячменя максимум синтеза БТШ достигается при 40°C, а в листьях риса – при 45°C. Необходимо заметить, что индукция синтеза отдельных представителей БТШ может различаться по температуре нагрева и его продолжительности. В результате можно различить ранние и поздние БТШ.

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 [15,16].

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 [1,16].

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 [1,16].

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 [13].

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 [1,13,5].

После окончания теплового шока синтез БТШ прекращается и возобновляется синтез белков, характерных для клетки в нормальных температурных условиях. При этом мРНК БТШ быстро разрушаются в клетках при нормальной температуре, тогда как сами белки могут сохраняться существенно дольше, обеспечивая, по-видимому, повышение устойчивости клеток к нагреву. Длительное пребывание клеток в условиях ТШ обычно также приводит к ослаблению и прекращению синтеза БТШ. В этом случае включаются механизмы регуляции экспрессии генов БТШ по принципу обратной связи. Накопление в клетках БТШ выключает активность их генов. Возможно, таким путем клетка поддерживает количество БТШ на необходимом уровне, препятствуя их сверхпродукции.

Переключение клеток всех живых организмов в условиях ТШ на синтез БТШ вызывает естественное предположение, что эти белки защищают клетки при стрессе. Однако нужны прямые доказательства их защитной функции. Общность структуры БТШ и молекулярных механизмов включения их синтеза при тепловом шоке у всех представителей живого мира позволяет, анализируя эту проблему, привлекать данные, полученные на разных организмах:

1) выключение синтеза белка специфическими ингибиторами во время теплового шока, когда происходит синтез БТШ, приводит к гибели клеток;

2) клетки можно закалывать, повышая их термоустойчивость путем предварительного кратковременного воздействия повышенных температур. Оказалось, что условия такой закалки совпадают с условиями индукции синтеза БТШ. Это хорошо показано в культуре клеток растений;

3) как выяснилось, синтез БТШ индуцирует не только ТШ, но и ряд других неблагоприятных воздействий. У животных таких дополнительных индукторов синтеза БТШ очень много, у растений к ним относятся, например, соли кадмия и арсенит. Оказалось, что синтез БТШ, вызванный солями Cd или другими нетемпературными воздействиями, повышает устойчивость клеток к нагреву; [5,13,15,16]

### 3. Методика измерений.

Для регистрации медленной индукции флуоресценции (МИФ) высечку из листа помещали в держатель, освещали широкополосным синим светом с длиной волны 450 нм и интенсивностью около 50 Вт/м<sup>2</sup> в течение 30 с, затем выдерживали в темноте в течение 5 мин (темновая адаптация), после чего включали тот же самый свет и регистрировали флуоресценцию Хл а на длине волны 686 нм.

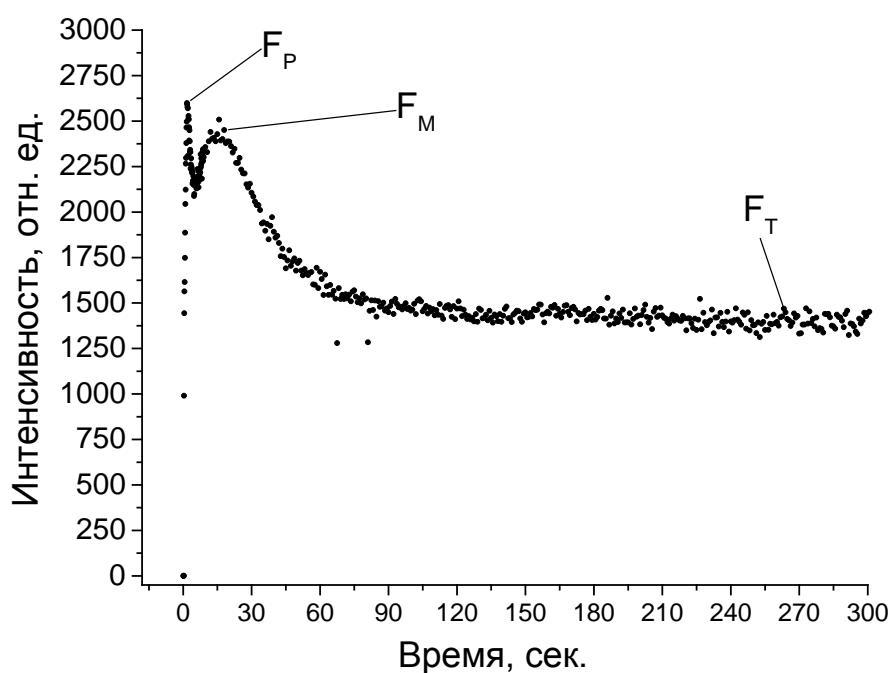


Рис. 6 Характерная индукционная кривая флуоресценции листьев бобов.

В качестве параметра МИФ использовались отношения  $Q1 = (F_P - F_T) / F_T$ , где  $F_P$  — максимальное значение интенсивности флуоресценции, достигаемое в первые секунды освещения,  $F_T$  — стационарный уровень флуоресценции (рис. 7) и  $Q2 = (F_M - F_T) / F_T$ , где  $F_M$  — второе максимальное значение интенсивности флуоресценции, достигаемое в промежутке 20-60 сек.

Индукцию флуоресценции также 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 900 с. Рассчитывались коэффициенты  $qP$  и  $qN$  (см. главу 2.2.2).

Растения бобов *Vicia faba* L. (сорт «Русские черные») выращивали в лаборатории в пакетах с грунтом объемом 0.5 л. Перед посадкой семена помещались в воду на три часа. В опытах использовали листья второго яруса трехнедельных проростков.

Растения бобов для эксперимента в главе 5 выращивали в парниковой камере. Она представляет собой металлический каркас, стенки которого сделаны из фольги для теплоизоляции. Внутри камеры источником света была белая светодиодная лампа (световой поток источника света 900 Лм). Дневной цикл освещения: в 9:00 свет включали, а с 20:00 до 9:00 лампа была выключена. Для обогрева использовались графитовые нагревательные провода. Температура в камере (ток через нагревательные провода) контролировалась терморегулятором 7801А. Точность поддержания температуры составляла около 1°C.

Тепловой стресс (глава 4 и 5): лист бобов, не отделяя от стебля, погружали в термостатический сосуд с водой и выдерживали в течение 15 мин при фиксированной температуре (в диапазоне от 24 до 44 °C) и пониженной освещенности. Точность поддержания температуры воды в сосуде составляла 0.25° C. После этого при комнатной температуре регистрировали индукционные изменения флуоресценции Хл а.

При исследовании эффекта закалки (глава 6) пакет с растениями помещался на сутки в парниковую камеру при очень низкой освещенности при температуре 25, 30, 35 и 40°C соответственно. После того как пакет с растениями бобов извлекался из парниковой камеры, в течение часа до измерений он находился при комнатной температуре при пониженной освещенности. В опытах использовали листья второго яруса трехнедельных проростков. Не отделяя лист от стебля, помещали в термостатический открытый сосуд с водой и выдерживали в течение 15 мин при фиксированной температуре: 25, 42, 43 или 44°C.

## 4. Влияние теплового стресса на флуоресцентные характеристики листьев бобов, выращенных в естественных условиях.

Идея эксперимента: получение температурной зависимости формы индукционных кривых флуоресценции листьев бобов, выращенных в естественных условиях.

Бобы выросли при комнатной температуре (в среднем около 25 °С) в лаборатории под белой светодиодной лампой.

Рассмотрим, как меняется вид кривой индукции флуоресценции с увеличением температуры воды в термостате. Ниже представлены индукционные кривые листьев бобов для разных температур 15-минутного прогрева в термостате с водой в порядке возрастания.

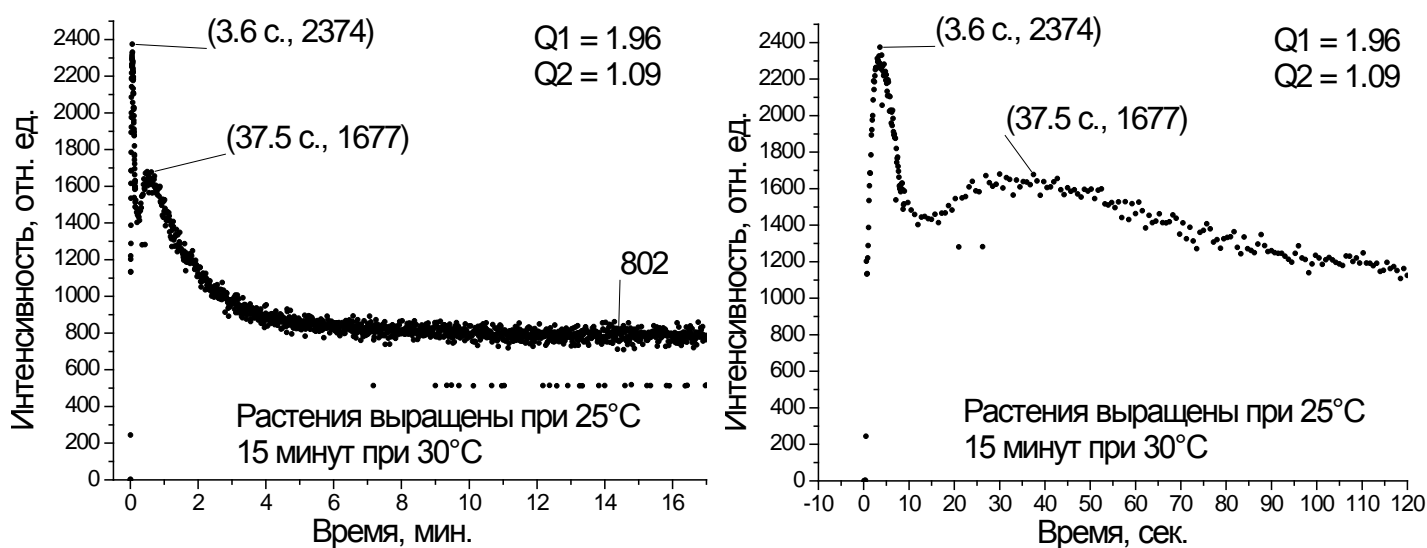


Рис. 7. Типичная индукция флуоресценции листьев бобов.

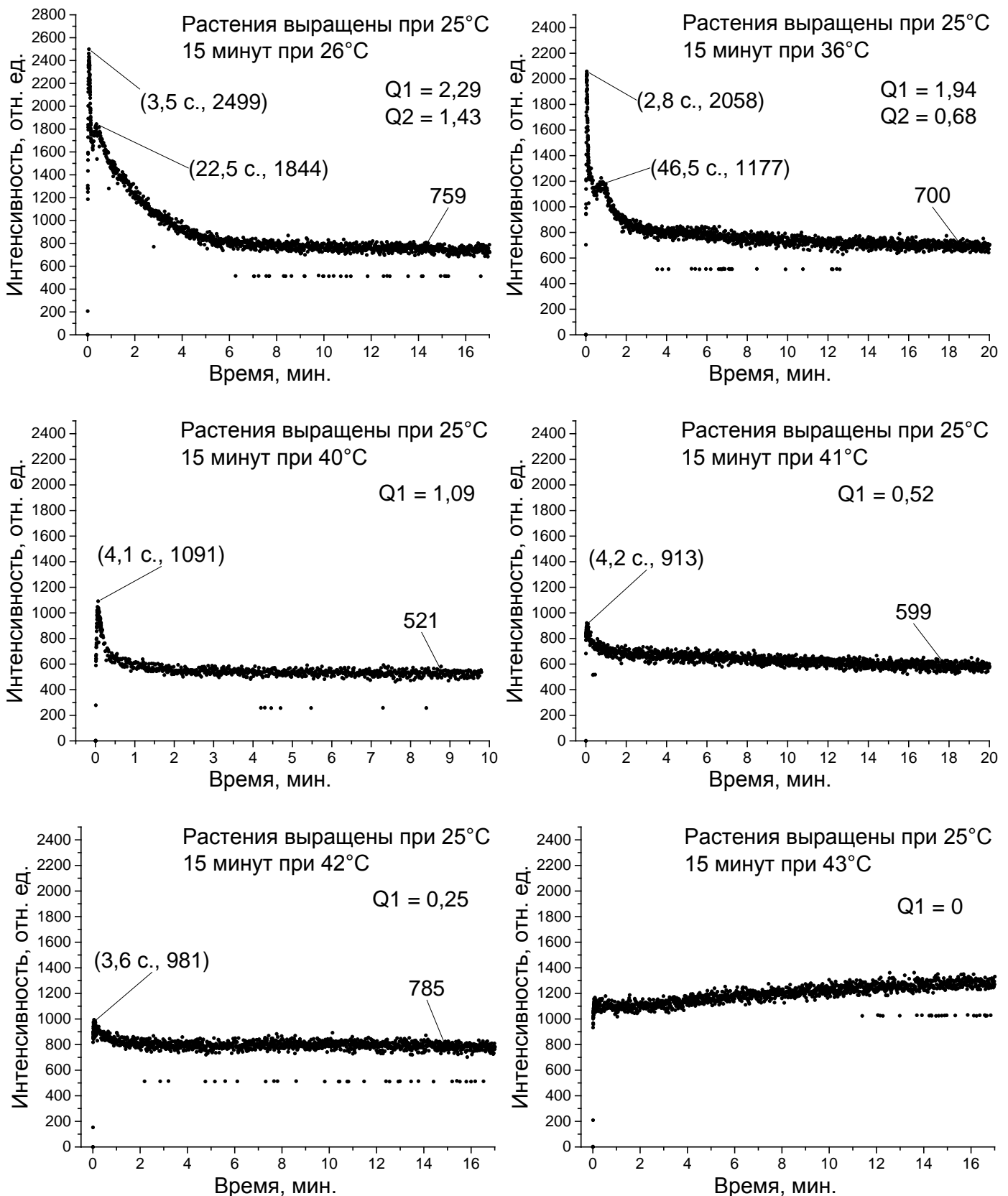


Рис. 8 Вид индукционных кривых в зависимости от температуры 15 минутного прогрева.

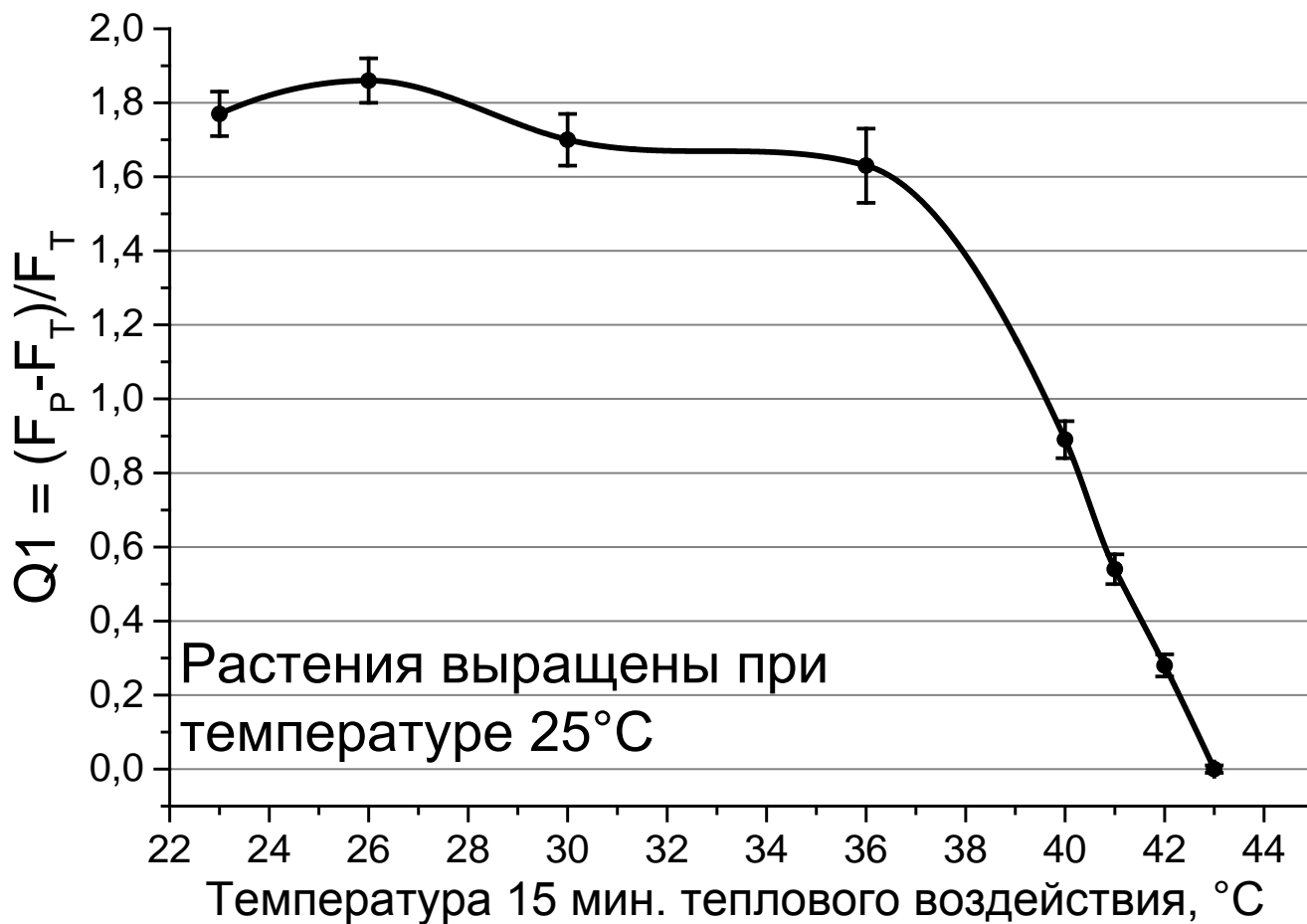


Рис. 9 Зависимость индукционного параметра  $Q1 = (F_P - F_T) / F_T$  от температуры 15 мин. теплового воздействия.

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. Увеличение температуры до 40°C приводит к исчезновению максимума М. Дальнейший прогрев приводит к уменьшению интенсивности пика Р. Зависимости значения интенсивности стационарного уровня FT от температуры не установлено. Резкое уменьшение параметра Q наступает при температурах выше 40 °C. После прогрева при температуре 43°C и выше, индукционные изменения флуоресценции отсутствуют.

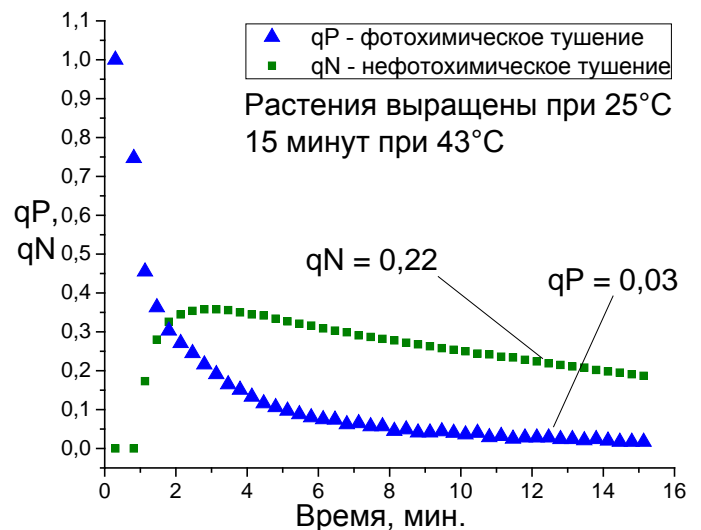
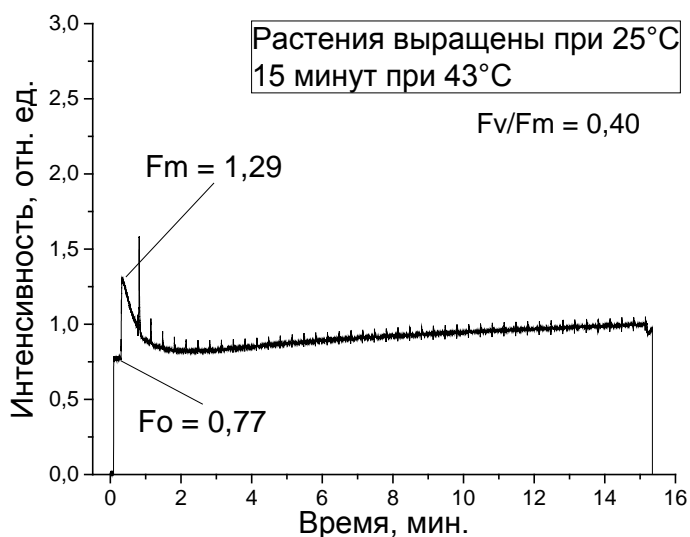
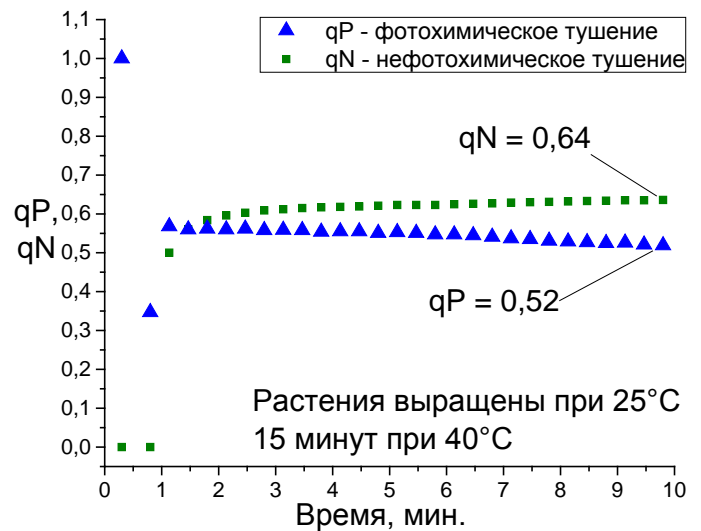
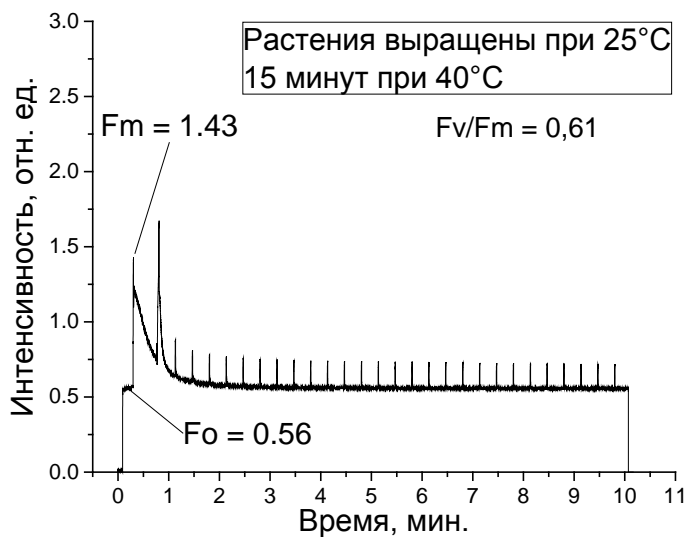
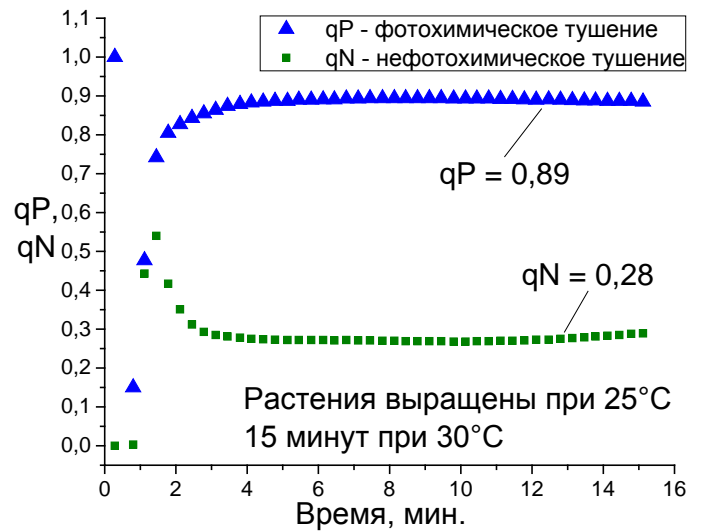
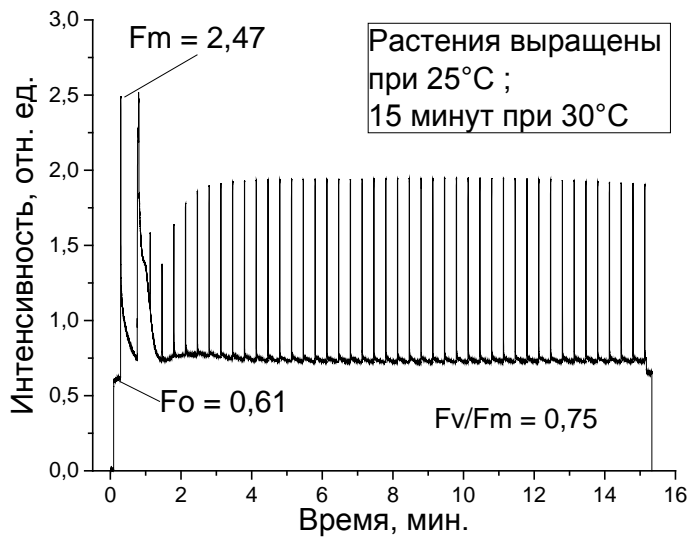


Рис. 10 Индукции флуоресценции, полученные при помощи РАМ-флуориметра, после 15-минутного теплового воздействия, характерные кривые. Коэффициенты фотохимического qP и нефотохимического qN тушения.

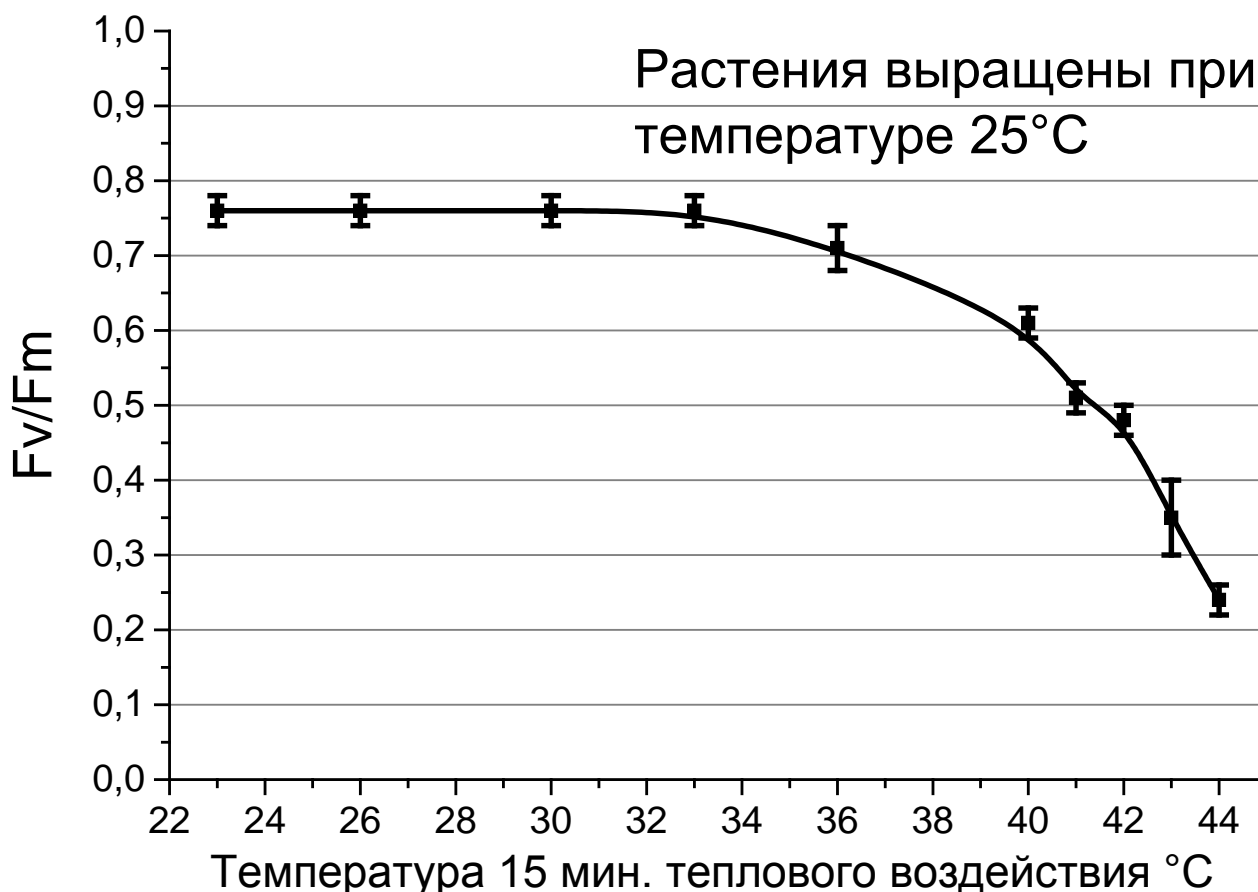


Рис. 11 Флуоресцентный индукционный параметр Fv/Fm.

Показатель  $Q1 = (FP - FT) / FT$  определяет относительное тушение флуоресценции Хл а в листьях растений, характеризует фотохимическую активность фотосинтетического аппарата и коррелирует со скоростью ассимиляции  $CO_2$  [1]. Следовательно, заметное уменьшение переменной флуоресценции после прогрева при температурах выше 36°C (снижение показателя  $Q1 = (FP - FT) / FT$ ) указывает сильное снижение фотосинтетической активности. Важно, что уменьшение показателя  $Q1 = (FP - FT) / FT$  обусловлено уменьшением значений FP (рис. 8), что указывает на нарушения в восстановлении первичных акцепторов электронов ФСII [1].

При температурах выше 36 °C наблюдается значительное уменьшение параметра Fv/Fm (рис.11), характеризующего максимальную фотохимическую активность ФСII [1,2]. Это также говорит о подавлении функциональной активности фотосинтетического аппарата. Уменьшение происходит в основном за счет уменьшения значений Fm, регистрируемых при освещении листа первой насыщающей вспышкой света. Что касается



уровня  $F_0$  фоновой флуоресценции при открытых реакционных центрах ФСII, то он остается практически неизменным, что могло бы указывать на отсутствие существенных нарушений в агрегации светособирающей антенны и РЦ [1].

Значения параметра  $q_N$  у растений, нагретых до 40-42°C резко увеличиваются. Увеличение  $q_N$  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  $F_m$ . В этом случае происходит нарушение связей между молекулами хлорофилла внутри антенны, а также между антенной и РЦ [1].

Снижение  $q_P$  при температурах выше 36°C (рис.12) может быть обусловлено увеличением текучести липидов в тилакоидных мембранах, что влияет на организацию и функцию ФС2 [1,13].

У растений, нагретых в течение 15 минут при 43 и 44°C, параметр  $q_N$  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 [1,2].

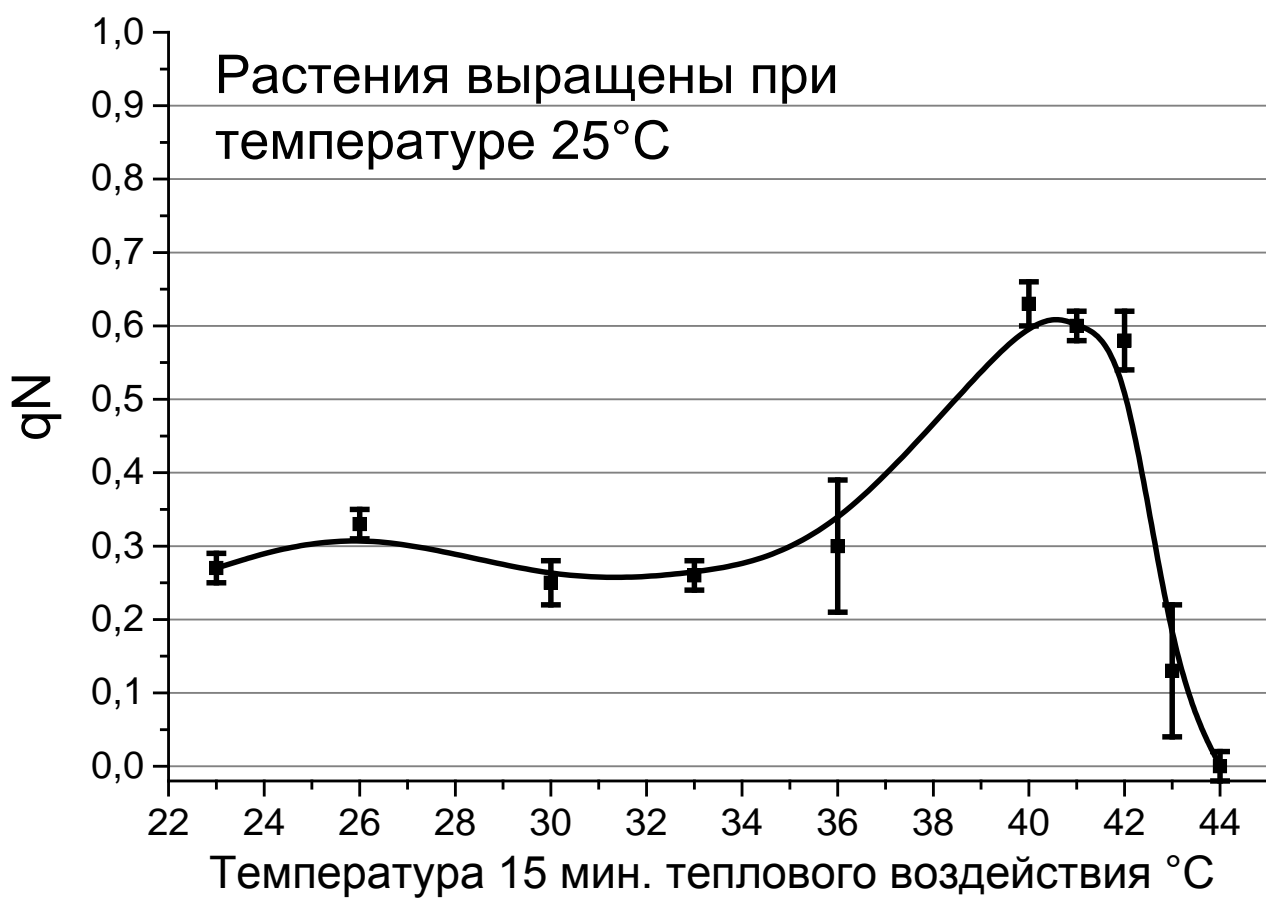
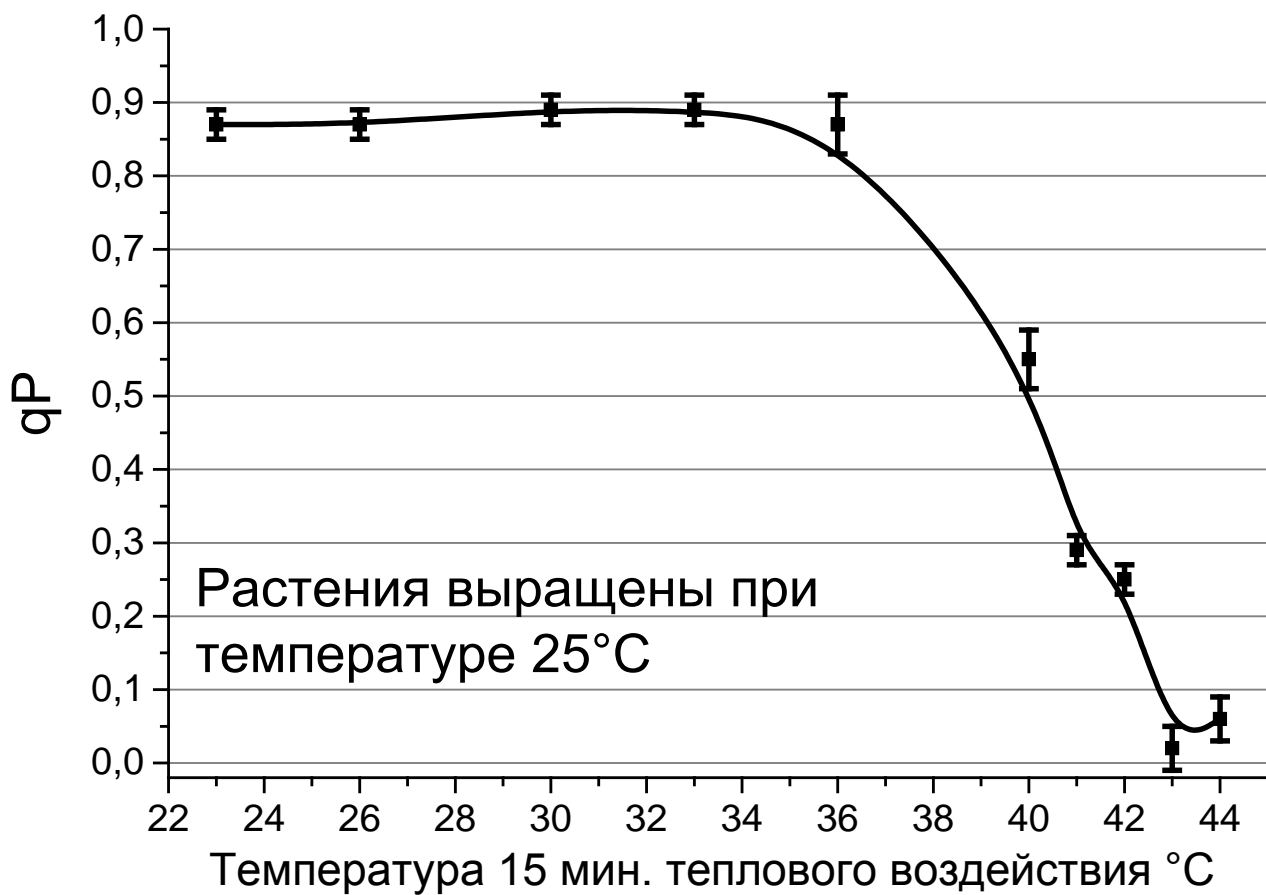


Рис. 12 Коэффициенты фото- и нефотохимического тушения

## **5. Влияние теплового стресса на флуоресцентные характеристики листьев бобов, выращенных при температурах 30 и 35°C.**

Идея эксперимента: получение температурной зависимости формы индукционных кривых флуоресценции листьев бобов, выращенных при температуре 30 и 35°C.

После того как пакет с растениями бобов извлекался из парниковой камеры, в течение часа до измерений он находился при комнатной температуре при пониженной освещённости. Два листа одного яруса погружались в термостатический сосуд с водой при температурах 30-44 °C на 15 минут. Далее для одного из них измерялась индукция флуоресценции согласно методике, для второго проводились измерения с использованием РАМ согласно методике.

Для листьев бобов, выращенных при температуре 30°C, показатель Q1 принимает максимальное значение после 15 минут теплового воздействия при 30°C, в то время как для листьев бобов, выращенных при температуре 35°C, показатель Q1 принимает максимальное значение после 15 минут теплового воздействия при 35°C (рис. 13). Это означает, что температура выращивания является «оптимальной» и при воздействии данной температуры растительные клетки сохраняют наибольшую фотохимическую активность фотосинтетического аппарата.

Значения показателя qP при температуре 42-43°C увеличиваются с увеличением температуры выращивания (рис. 14). Это может быть обусловлено уменьшением текучести липидов в тилакоидных мембранах за счёт синтеза специфических белков теплового шока, что влияет на организацию и функцию ФС2.

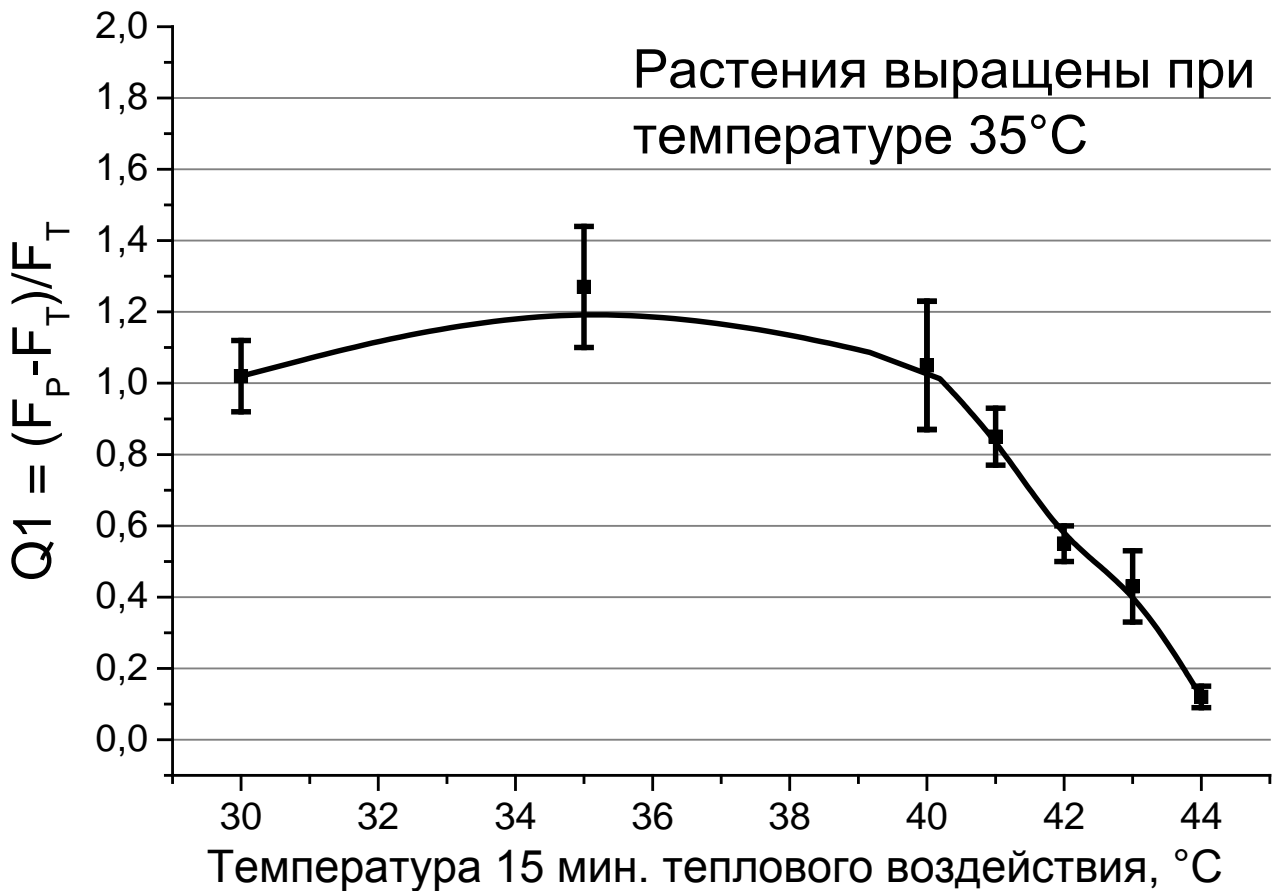
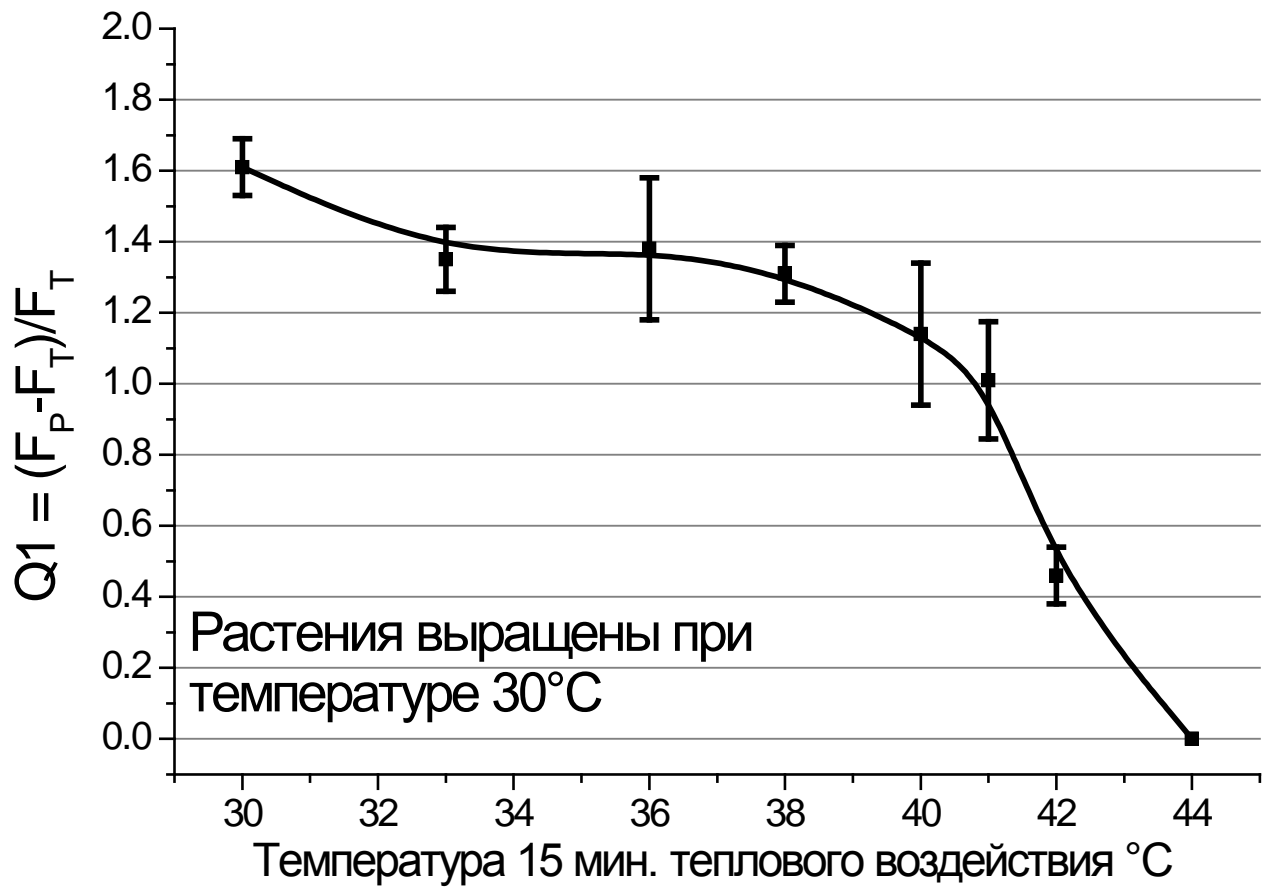


Рис. 13 Зависимость индукционного параметра  $Q1 = (F_P - F_T) / F_T$  от температуры 15 мин. теплового воздействия для листьев бобов, выращенных при температурах 30 и 35°C.

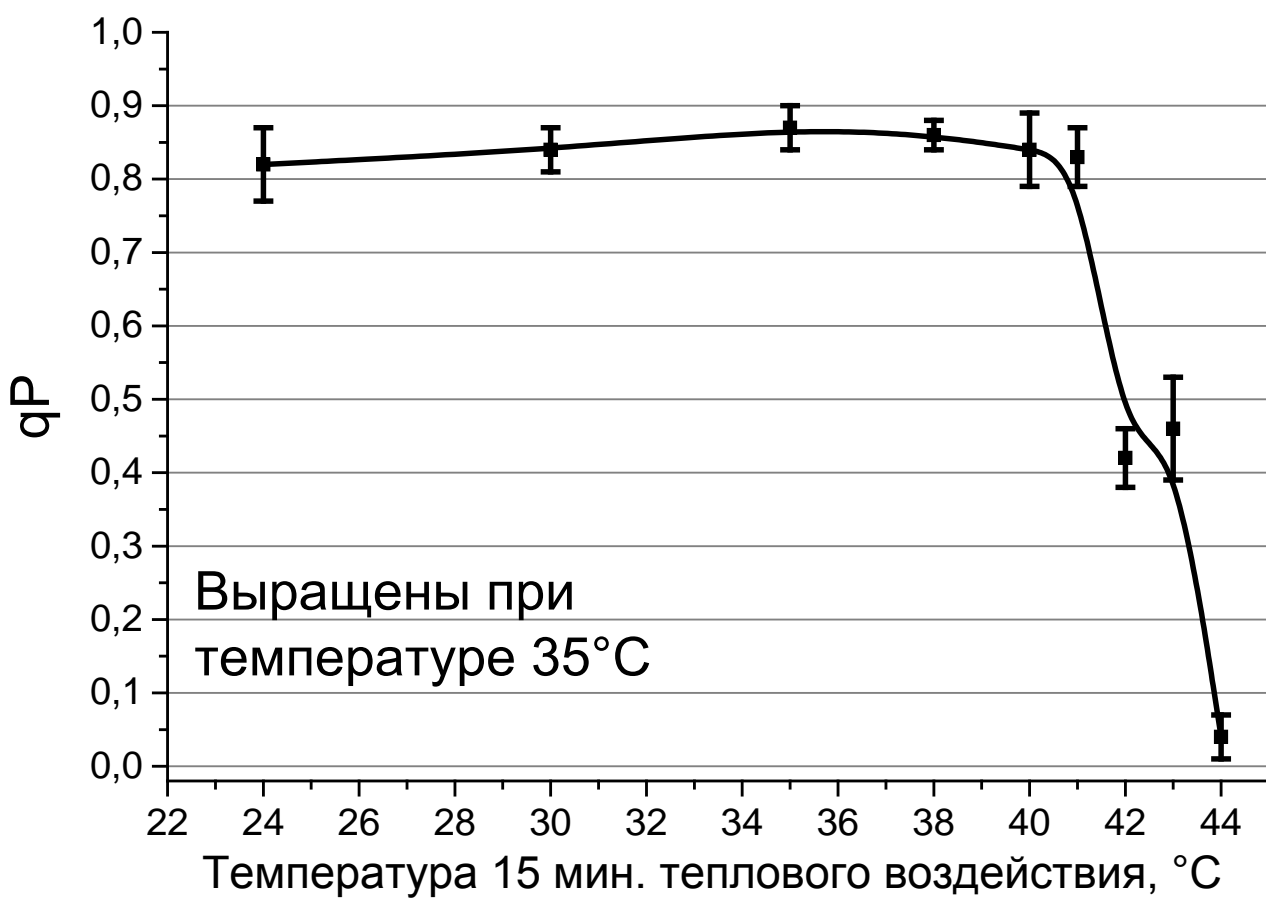
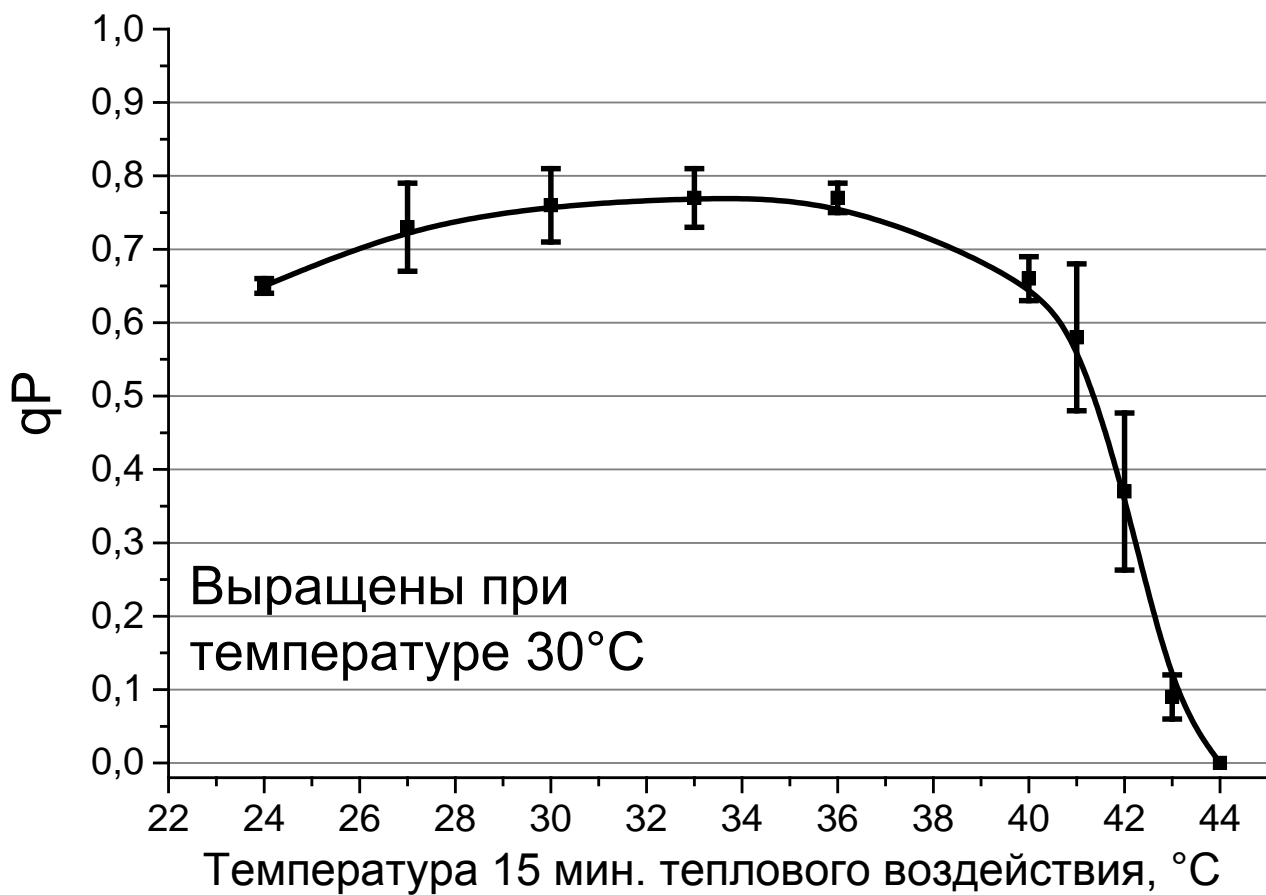


Рис. 14 Коэффициенты фотохимического тушения для листьев бобов, выращенных при температурах 30 и 35°C.

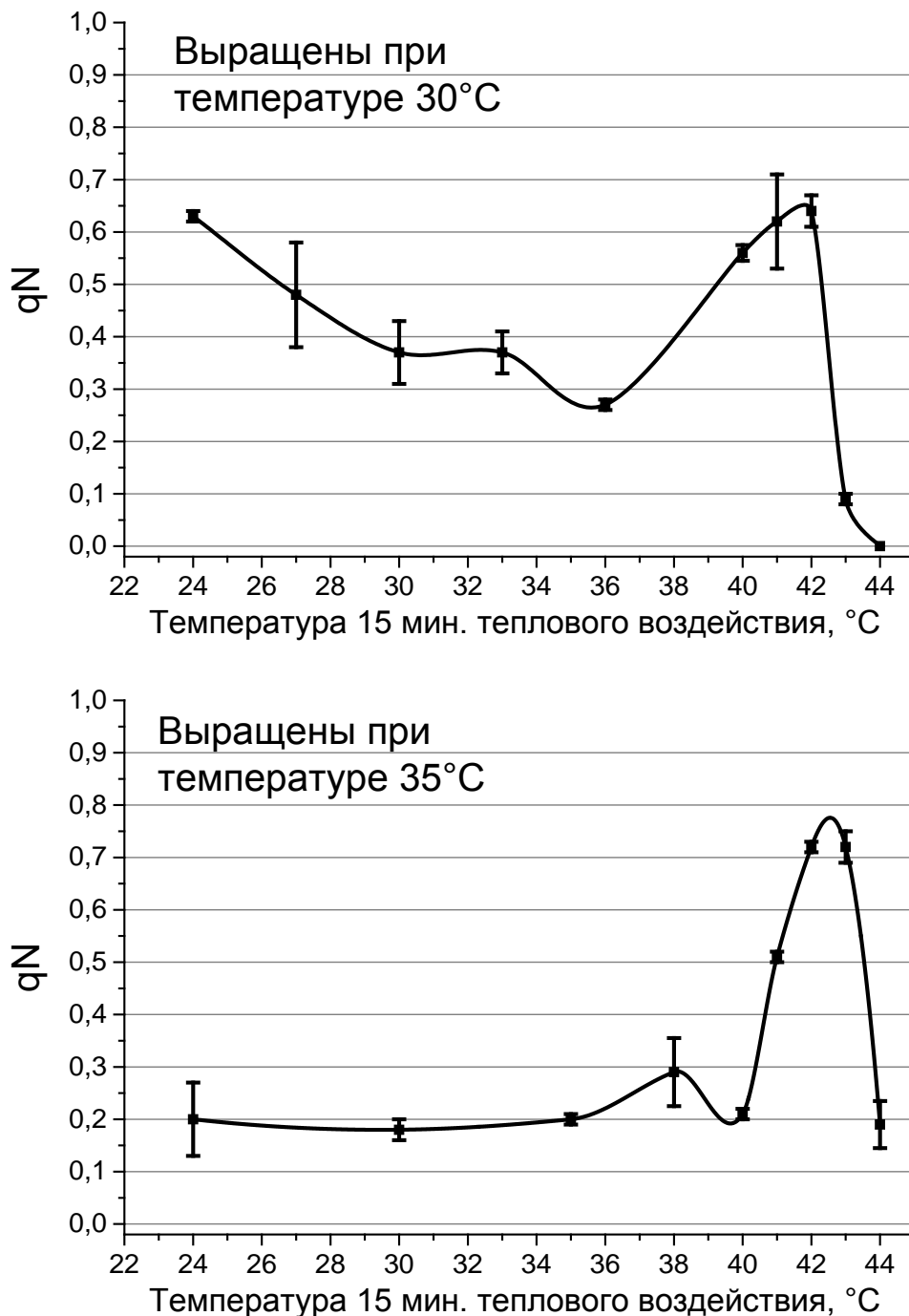


Рис. 15 Коэффициенты нефотохимического тушения для листьев бобов, выращенных при температурах 30 и 35°C.

Для листьев бобов, выращенных при температуре 35°C, значение показателя  $qN$  при температуре 43°C значительно выше, чем у листьев бобов, выращенных при температурах 25 и 30°C, и является максимальным. Увеличение  $qN$  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 [20].

## 6. Индукционные изменения флуоресценции листьев бобов после теплового стресса. Эффект закаливания.

Бобы выросли при комнатной температуре (в среднем около 25 °С) в естественном освещении.

Закалка: пакеты с растениями помещались на день в парниковую камеру при очень низкой освещённости при температуре 25, 30, 35 и 40°С соответственно.

После того как пакет с растениями бобов извлекался из парниковой камеры, в течение часа до измерений он находился при комнатной температуре при пониженной освещённости. Лист бобов погружался в термостатический сосуд с водой при температурах 25, 42, 43 и 44 °С на 15 минут. Далее измерялась индукция флуоресценции согласно методике.

Известно, что прогрев до температур примерно 45 °С блокирует нециклический транспорт электронов. Постепенное подавление переменной флуоресценции после прогрева при температурах 42 °С и выше (снижение показателя  $(F_P - F_T)/F_T$ ) указывает на прогрессирующее снижение фотосинтетической активности.

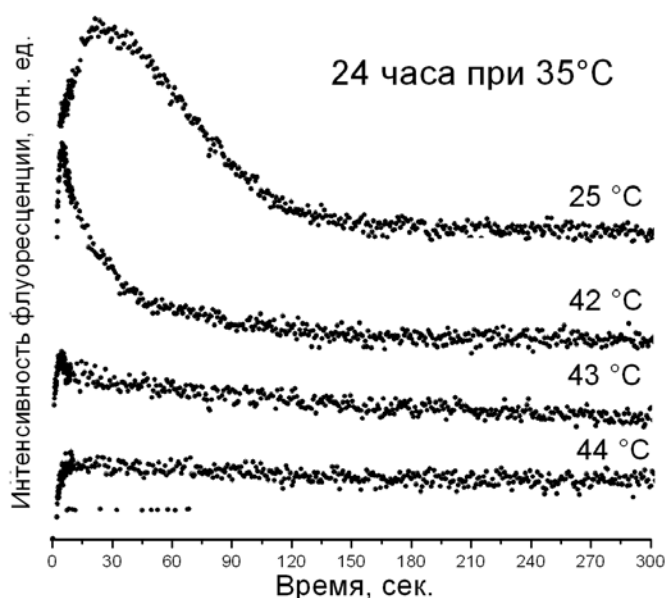


Рис. 15. Индукционные изменения флуоресценции листьев бобов после прогрева при разных температурах.

Согласно данным литературы относительное тушение флуоресценции хлорофилла а в листьях растений (показатель  $Q_1 = (F_P - F_T)/F_T$ ) характеризует фотохимическую активность фотосинтетического аппарата и коррелирует со

скоростью ассимиляции  $\text{CO}_2$  [1]. Предварительный прогрев растений бобов при  $35^\circ\text{C}$  в течение 24 часов благоприятно влияет на устойчивость фотосинтетического аппарата к тепловому воздействию (рис. 16).

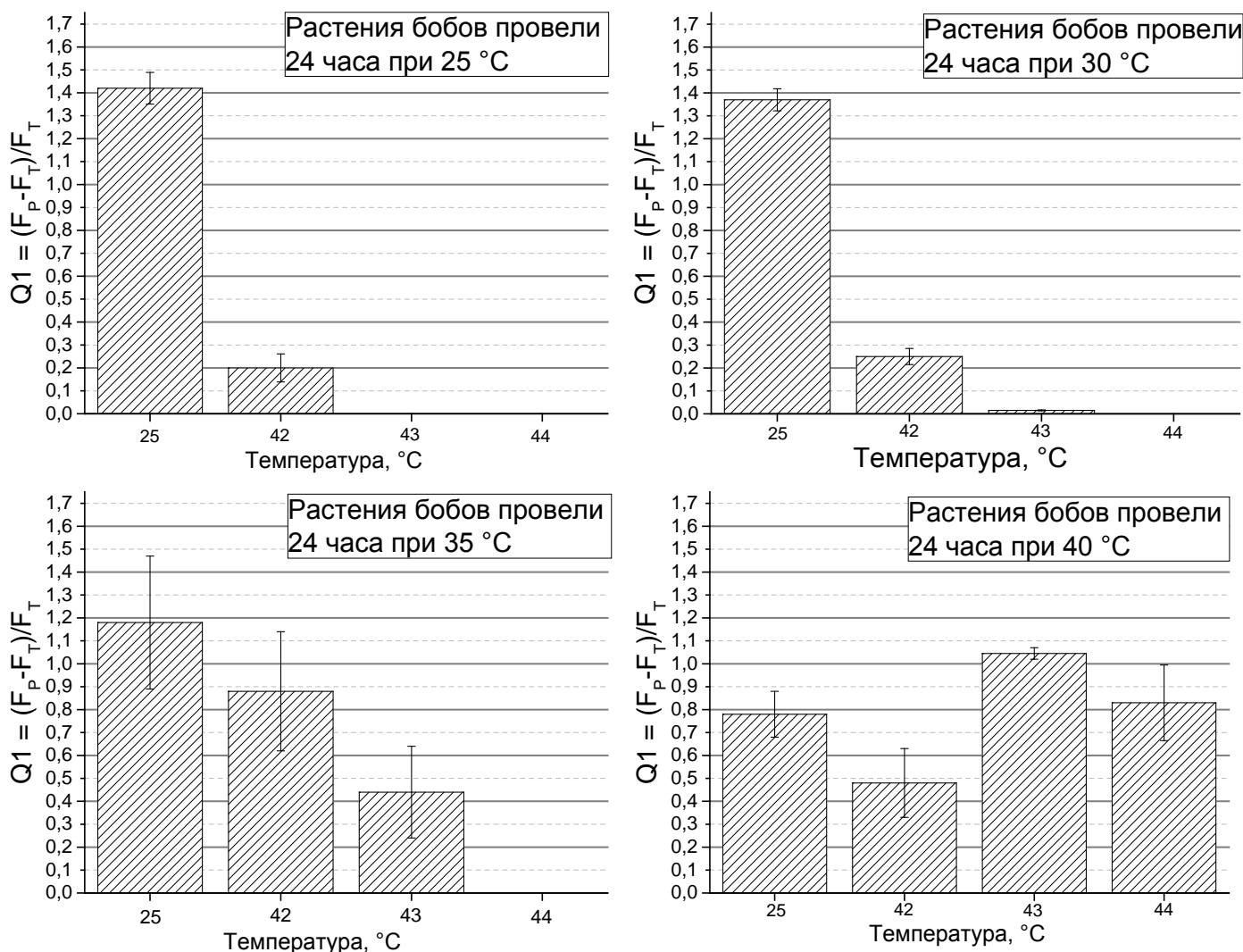


Рис. 16. Изменение величины параметра  $Q1 = (F_p - F_T) / F_T$  кривых МИФ после 24 часового прогрева в тепловой камере при температурах 25 и  $35^\circ\text{C}$ . Эффект закалки.

Увеличивается значение параметра  $Q1 = (F_p - F_T) / F_T$ , характеризующего относительное тушение флуоресценции. Уменьшение показателя  $Q1 = (F_p - F_T) / F_T$  обусловлено уменьшением значений  $F_p$  при незначительном увеличении  $F_T$  (рис. 15, 16), что указывает на нарушения в восстановлении первичных акцепторов электронов ФСII [1].

Дополнительно были измерены кривые индукции, а и посчитаны коэффициенты нефотохимического и фотохимического тушения флуоресценции после теплового воздействия в течение 15 минут при температурах 25, 42, 43, 44 °C с предварительным закаливанием при температурах 25, 30, 35, 40 с помощью портативного РАМ-флуориметра.



Посмотрим, как отличаются индукции флуоресценции листьев после 15-минутного стресса при 42°C. Характерные кривые:

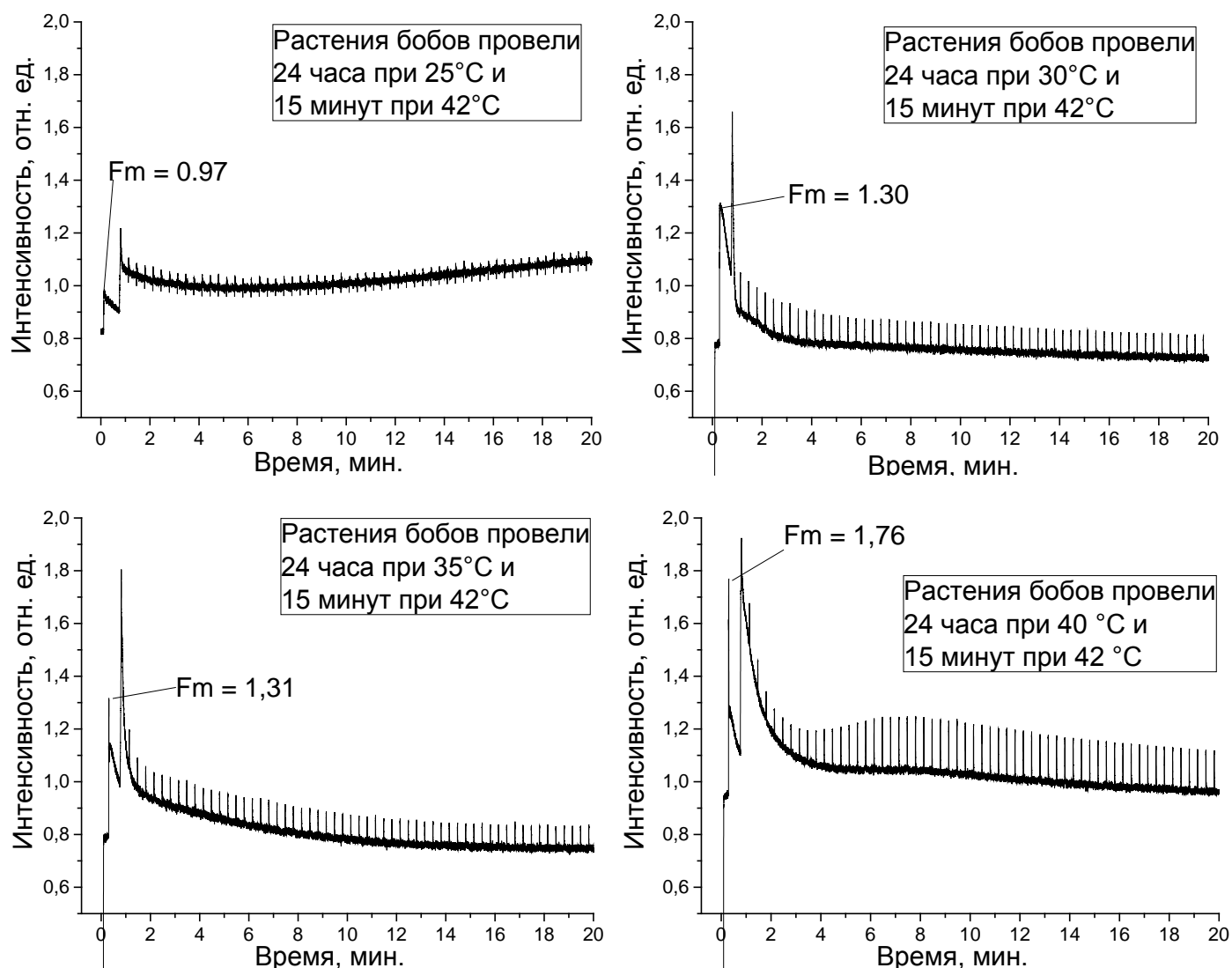


Рис. 17. Индукции флуоресценции листьев после 15-минутного стресса при 42°C.

На первом графике видно, что реакция на вспышки практически отсутствует.  $F_m'$  и  $F_m$  повышаются при увеличении температуры закали. Увеличение  $F_m$  коррелирует с повышением фотохимической активности.

Также были проведены измерения кривых индукции флуоресценции после 3 часовой закалки при температуре 40°C.

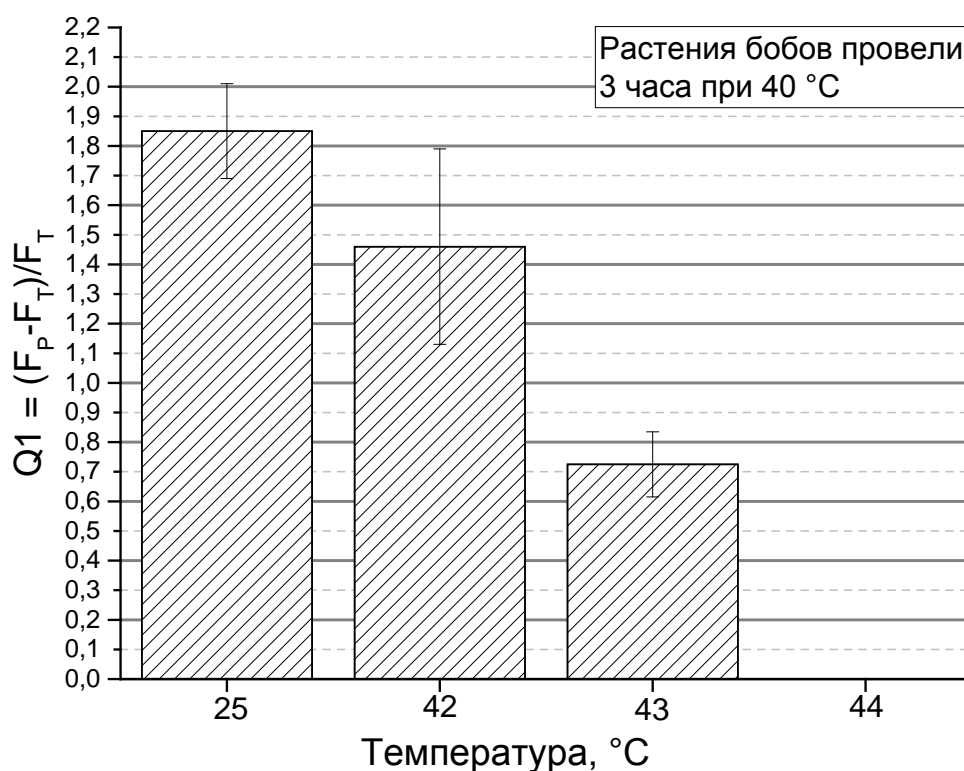


Рис. 18. Кривые индукции флуоресценции после 3 часовой закалки при температуре 40°C..

Сравним с полученными данными для листьев бобов, подвергавшихся тепловому стрессу в течение 24 часов при температурах 25-40°C (рис. 16). Закалка в течение 3 часов при 40°C оказалась примерно такой же эффективной, как и сутки при 35°C.

Измерение и анализ кривых МИФ листьев бобов позволил продемонстрировать эффект «закаливания» растений — увеличение устойчивости фотосинтетического аппарата к температурам 42 и 43 °C. Установлено, что прогрев листьев бобов при температуре 35°C замедляет снижение фотохимической активности ФСII, характеризуемое уменьшением относительного тушения флуоресценции  $(F_p - F_t)/F_t$  кривой МИФ, и увеличивает коэффициенты тушения.

## 7. Результаты и выводы.

1. Установлены закономерности в изменении формы кривых медленной индукции флуоресценции листьев бобов после 15-минутного прогрева в диапазоне температур 24-44 °С. Постепенное снижение переменной флуоресценции (параметры  $Q_1 = (F_p - F_T)/F_T$ ,  $F_v/F_m$ ), уменьшение коэффициента фотохимического тушения ( $qP$ ) и увеличение коэффициента нефотохимического тушения ( $qN$ ) после прогрева при температурах выше 36°С свидетельствует о прогрессирующем снижении фотохимической активности фотосистемы 2.

2. У растений, выращенных при 30 и 35°С, показатель  $Q_1 = (F_p - F_T)/F_T$ , характеризующий относительное тушение флуоресценции хлорофилла а в индукционном периоде, достигает максимальных значений после 15-минутного прогрева при тех же самых температурах - 30 и 35 °С соответственно, что свидетельствует об адаптации фотосинтетического аппарата к повышенным температурам при выращивании. Эффект адаптации, как предполагается, связан с синтезом белков теплового шока, защищающих тилакоидные мембраны от теплового стресса.

3. Измерение и анализ кривых медленной индукции флуоресценции листьев бобов позволил выявить эффект "закаливания" - повышение устойчивости фотосинтетического аппарата к температурам 42 и 43 °С после предварительного выдерживания растений в течение 24 часов при 35°С.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о высокой информативности и перспективности метода индукции флуоресценции хлорофилла при изучении устойчивости растений к неблагоприятным воздействиям.

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 °С 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 ретикулума. 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 ретикулуме. Предположительно они защищают от теплового шока тилакоидные мембраны, в которых локализованы процессы трансформации световой энергии в химическую.

## 8. Литература

1. И. П. Левыкина, В. А. Караваев - Индукционные изменения флуоресценции листьев бобов после теплового воздействия, ВМУ. Серия 3. Физика. Астрономия. № 1. Биофизика и медицинская физика, 2016
2. Kate Maxwell, Giles N. Johnson, Chlorophyll fluorescence – a practical guide. // Journal of Experimental Botany , Vol. 51, No.345, pp. 659 – 668, 2000
3. Тихонов А.Н., Трансформация энергии в хлоропластах – энергопреобразующих органеллах растительной клетки // Соросовский Образовательный Журнал. 1996. № 4. С. 24–32.
4. Тихонов А.Н., Регуляция световых и темновых стадий фотосинтеза // Соросовский Образовательный Журнал. 1999. № 11. С. 8–15.
5. Кулаева О.Н. - Белки теплового шока и устойчивость растений к стрессу, Соросовский Образовательный Журнал. 2, 1997
6. Алехина Н. Д., Балнокин Ю. В., Гавриленко В. Ф., Жигалова Т.В., Мейчик Н.Р., Носов А.М., Полесская О.Г., Харитонашвили Е.В., Чуб В.В. Физиология растений М.: Академия. 2005. 640 с.
7. Govindjee, J. Amesz, and D. D. Fork - Light Emission By Plants and Bacteria, Academic Press, Orlando, 1986.
8. Асланиди К.Б., А.А. Шалапенко, Карнаухов В.Н., Берестовская Н.Г., Шавкин В.И. Метод определения функционального состояния растений по спектрам флуоресценции хлорофилла. // Пушино 1988
9. G.H. Krause, Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bioi. 1991.42:313-49
10. Карапетян Н.В., Бухов Н.Г. Переменная флуоресценция хлорофилла как показатель физиологического состояния растений // Физиология растений. 1986. Т. 33. С. 1013-1026.
11. Малый практикум по физиологии растений / Под ред. Гусева М.В. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1982. 192 с.
12. Rajni Govindjee and George Hoch - Emerson Enhancement Effect in Chloroplast Reactions, Plant Physiology 1963
13. Яковец О.Г. Фитофизиология стресса: курс лекций – Минск: БГУ, 2011.
14. Борисова Г.Г., Малева М.Г., Чукина Н.В., Растение и стресс, курс лекций, Екатеринбург, Уральский государственный университет им. А.М. Горького, 2008

15. И.В. Косаковская Стрессовые белки растений, Национальная Академия Наук Украины Институт Ботаники Им. Н.Г. Холодного, Киев 2008
16. Кошкин Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур, Саратовский Государственный Аграрный Университет имени Н.И. Вавилова, Саратов, 2014.
17. Berry J., Björkman O. // *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1980. 31. P. 491.
18. Allakhverdiev S.I., Kreslavski V.D., Klimov V.V. et al. // *Photosynth. Res.* 2008. 98. P. 541.
19. Караваев В.А. Нелинейные регуляторные процессы в фотосинтезе высших растений Дисс. ... докт. физ.-мат. наук. М.: МГУ, 1990, 416 с.
20. Рубин А.Б. Биофизические методы в экологическом мониторинге // *Соросовский образовательный журнал*, 2000, т. 6, №4, с. 7-13.