

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ РОСЛИН І ГЕНЕТИКИ

Корнєєв Дмитро Юрійович

УДК 581.132

ВИВЧЕННЯ СТАНУ ФОТОСИНТЕТИЧНОГО АПАРАТУ  
ЗА ДОПОМОГОЮ МЕТОДУ ІНДУКЦІЇ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ  
ХЛОРОФІЛУ

*kov*

03.00.12 - фізіологія рослин

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ - 1997

Дисертацією є рукопис

ЛБ 50.017

Робота виконана в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України

Науковий керівник - доктор біологічних наук, професор  
Кочубей Світлана Михайлівна  
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України  
зав. відділом

Офіційні опоненти - доктор біологічних наук, професор  
Сіренко Лідія Якимівна,  
Інститут гідробіології НАН України  
головний науковий співробітник  
  
кандидат біологічних наук  
Китаєв Олег Ігоревич  
Інститут садівництва УААН  
старший науковий співробітник

Провідна установа - Національний університет ім. Тараса Шевченка,  
біологічний факультет, Міністерство освіти України, м.Київ

Захист відбудеться 25 грудня 1997 р. о 10 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 50.09.01 при Інституті фізіології рослин і генетики НАН України за адресою: 252022, Київ-22, вул. Васильківська 31/17

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту фізіології рослин і генетики НАН України, Київ, вул. Васильківська 31/17

Автореферат розісланий " 20 " листопада 1997 р.

Вчений секретар спеціалізованої ради

Труханов В.А.

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00751636 (S)

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

### Актуальність теми.

Дослідження стану фотосинтетичного апарату (ФСА), його змін у відповідь на дію факторів зовнішнього середовища та відмінностей, обумовлених особливостями генотипу фотосинтезуючих об'єктів, є важливим завданням фізіології рослин. Одним з ефективних методів, що використовуються для вирішення цього завдання, є запис кривих індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ). Він належить до непошкоджуючих (нативних) методів, відрізняється високою чутливістю до змін фізіологічного стану рослин та дозволяє стежити за фізіологічними процесами в їх динаміці. Велике значення для успішного використання методу має подальше удосконалення існуючих та розробка нових методичних підходів до аналізу стану фотосинтетичного апарату на основі вивчення кривих ІФХ. Дана дисертаційна робота присвячена, головним чином, саме цій проблемі.

В ході роботи були виконані також експерименти, в яких вивчали ряд інших актуальних питань, що стосуються проблем гетерогенності фотосистеми 2 (ФС2), змін стану ФСА за умов фосфорилювання мембранних білків хлоропластів або при дії несприятливих факторів навколишнього середовища. Це дозволило певною мірою розширити уявлення про початкові фази розвитку різних типів стресу на рівні електрон-транспортного ланцюга, а також розробити підходи, за допомогою яких можна оцінювати чутливість генотипів до цих стресів.

### Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Роботу виконано в рамках тематики відділу біохімії фотосинтезу (програми фундаментальних досліджень "Вивчити регуляторну роль мембранних фосфопротейнів хлоропластів у зв'язку з направленістю первинного процесу фотосинтезу", № державної реєстрації 01.85.0.013470; "Вивчити особливості регуляції фотосинтетичного апарату у  $C_3$  та  $C_4$ -рослин у різних умовах вирощування", 2.28.6) а також проєктів ДКНТ ("Дослідження регуляторної функції світлозбираючого комплексу фотосинтетичного апарату вищих рослин", реєстраційний № 5.1/166, "Вивчення ролі гліколатного обміну в регуляції фотосинтетичного метаболізму вуглецю в клітинах  $C_3$ -рослин", № 5.2/6, "Регуляція взаємозв'язку світлових процесів і вуглецевого метаболізму в фотосинтезуючих клітинах: роль мембранних фосфопротейнів", № 5.2/38; "Дослідження взаємозв'язку регенераційної здібності культури клітин *in vitro* із сформованістю та активністю фотосинтетичного апарату", № 5.3/263, "Дослідження гетерогенності організації і функціонування фотосистеми 1 в мембранах  $C_3$ -рослин", № 5.4/69)

ЛНБ ім. В. Стефанька  
АН України

Мета і задачі дослідження.

Метою даної роботи було розробити нові підходи до аналізу стану ФСА за допомогою методу ІФХ та використати ці підходи у вивченні змін організації ФСА в об'єктах різного рівня складності під впливом модифікацій умов навколишнього середовища та в залежності від генотипу рослин.

У зв'язку з цим були поставлені такі задачі:

- 1) розробити нові параметри на основі кривих ІФХ для отримання інформації про стан ФСА;
- 2) використовуючи субхлоропластні фрагменти, вивчити стан ФС2 в різних ділянках тилакоїдної мембрани та його зміни у контактуючих зі строною зонах тилакоїдної мембрани в результаті фосфорилювання мембранних білків хлоропластів або підвищення температури вирощування;
- 3) провести дослідження змін стану ФСА у хлоропластах внаслідок фосфорилювання мембранних білків хлоропластів, а також збільшення або зменшення температури навколишнього середовища, зниження рівня освітленості;
- 4) дослідити залежність параметрів кривої ІФХ від регенераційної здатності калусів та наявності ядерно-цитоплазматичної несумісності у цибридних рослин;
- 5) вивчити вплив варіацій складу атмосфери під час освітлення листків світлом високої інтенсивності на стан ФСА проростків пшениці різних за посухостійкістю сортів.

Наукова новизна одержаних результатів.

Вперше показано, що при фосфорилюванні мембранних протеїнів здійснюється міграція комплексів ФС2 з Qb-відновлюючими реакційними центрами на ділянки тилакоїдів, що експоновані у строми. Показано, що вони здатні транспортувати електрони до ФС1. Це явище спостерігалось для гороху та кукурудзи, які є представниками C<sub>3</sub> та C<sub>4</sub>-рослин.

Вперше за допомогою методу ІФХ встановлено, що Qb-відновлюючі комплекси ФС2, які розташовані на крайових (маргінальних) ділянках гранальних тилакоїдів, мають менший розмір світлозбираючої антени, ніж ті, що розташовані у внутрішніх ділянках.

Вперше показано, що відхилення температури вирощування рослин від оптимальної (як її збільшення, так і зменшення) викликає зростання частки Qb-невідновлюючих комплексів ФС2 в мембранах хлоропластів.

Вперше встановлено, що неповний розвиток ФСА в калусній тканині кукурудзи призводить до підвищення частки Qb-невідновлюючих комплексів ФС2. Аналогічний наслідок викликається наявністю ядерно-цитоплазматичної несумісності у цибридних рослин томату.

Практичне значення одержаних результатів.

Запропоновані нові параметри для тестування стану ФСА, які базуються на розрахунку похідних від кривих ІФХ. Розроблені процедури оцінки ефективного розміру світлозбираючої антени Qb-відновлюючих комплексів ФС2 та середньої кількості акцепторів електронів, яка припадає на один реакційний центр цих комплексів. Показано, що параметр  $(FpI-Fo)/Fv$ , який використовують для визначення відносної кількості Qb-невідновлюючих комплексів ФС2, може бути використаний для тестування наявності стресового навантаження та для відбору генотипів, стійких до дії різних стресів.

Особистий внесок здобувача.

Дисертант особисто проробив відповідну літературу та оволодів необхідними методами досліджень, приймав участь у плануванні дослідів, підготовці матеріалів до друку. Експериментальні криві ІФХ та результати їх аналізу, які наведені в дисертаційній роботі, одержані здобувачем самостійно.

Апробація результатів дисертації.

Основні результати роботи були представлені на V та VI конференціях молодих вчених "Актуальні проблеми фізіології рослин та генетики" (Київ, 1992 та 1996), II з'їзді українського товариства фізіологів рослин (Київ, 1993), конференції молодих вчених та спеціалістів "Наукові основи ведення сільського господарства в сучасних умовах" (Чабани, 1994), I з'їзді українського біофізичного товариства (Київ, 1994), міжнародній нараді "Актуальні питання фізіології рослин в аспекті екологічних проблем України" (Чернівці, 1995), міжнародній конференції "Біоенергетика фотосинтезу" (Пуціно, 1996), XX Конгресі федерації Європейських товариств фізіологів рослин (Флоренція, 1996), VI молодіжній конференції ботаніків (Санкт-Петербург, 1997), III симпозиумі Російського товариства фізіологів рослин "Фізико-хімічні основи фізіології рослин та біотехнологія" (Москва, 1997).

Публікації.

Результати дисертації опубліковані в 4 статтях у наукових журналах та в 15 тезах конференцій.

Структура дисертації.

Дисертація складається із вступу, 5 розділів основної частини, висновків, списку використаних джерел, який включає 178 найменувань. Робота викладена на 173 сторінках друкованого тексту, містить 20 ілюстрацій та 12 таблиць.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Рослини гороху (*Pisum sativum* L.) сорту Рапорт, кукурудзи (*Zea mays*) інбредних ліній П34G та F 7, пшениці (*Triticum turgidum* L., *Triticum dicoccum* Shuebl., ряд сортів *Triticum aestivum* L.) вирощували на вегетаційній площадці в посудинах, наповнених ґрунтом та піском у співвідношенні 2:1, при середній інтенсивності світла в денний період 300 Вт/м<sup>2</sup> та температурі 12-25°C. В окремих дослідях рослини гороху вирощували при температурах 15°C та 28°C в кліматичних камерах ВКШ-1 (інтенсивність світла 30 Вт/м<sup>2</sup>).

Калусні тканини кукурудзи (*Zea mays* L.) ліній П346, П502, С455 були отримані від Т.М.Чеченевої (відділ цитогенетики ІФРГ НАН України). Рослини томату (*Lycopersicon esculentum* сорту Quedlinburger Frühe Libe, *L. peruvianum* var. *dentatum* лінії 3767 та їх цитоплазматичний гібрид клона 1С, який мав генوم *L. esculentum* Mill. та плазмагени *L. peruvianum* var. *dentatum* Dun.) були надані А.С.Кочевенко (відділ клітинної селекції Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України).

Для отримання хлоропластів використовували листки середнього ярусу 2-тижневих проростків гороху. Хлоропласти другого класу виділяли за методикою (Островська та інш., 1975). Середовище виділення складалось із 40-50 мМ трицинового (NaOH, pH 7,5) або фосфатного (pH 7,8) буферу, 0,4 М сахарози та 5 мМ MgCl<sub>2</sub>.

Фосфорилування мембранних білків хлоропластів в аеробних умовах проводили в середовищі, яке містило 0,1 мМ сахарози, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ NaCl, 10 мМ трицин-NaOH (pH 7,5), 0,2 мМ АТФ та 10 ммоль/л NaF (інгібітор фосфатази) при освітленні білим світлом (70 Вт/м<sup>2</sup>) на протязі 15 хвилин. При анаеробному фосфорилуванні до реакційної суміші додавали 20 мМ глюкози та 2 мг/мл глюкозооксидази.

Субхлоропластні фрагменти отримували шляхом дигітонінової фрагментації та послідовного центрифугування. Використовували осади при 20 000×g, 70 000×g та 100 000×g - фракції Фр1, Фр2 та Фр3, відповідно. В дослідях з фосфорилуванням осад при 100 000×g одержували з супернатанту після 20 000×g. Час центрифугування для всіх фракцій - 30 хвилин.

Експозицію на світлі високої інтенсивності проводили, використовуючи невідокремлені від рослин пшениці листки, розміщуючи їх у термостатованих плексигласових камерах з різним складом атмосфери.

Кінетичні зміни флуоресценції записували на однопроменевій установці. Флуоресценцію збуджували випромінюванням ртутної дугової лампи ДРШ-250-2, яке пропускали крізь фотозатвор (час відкриття - 3 мс), синьо-зелений фільтр СЗС-3 та ковзету з 2% розчином CuSO<sub>4</sub>. Флуоресценцію фіксували за допомогою монохроматору МДР-2 на довжині хвилі 685 нм. Сигнал від фотопомножувача ФЕП-79 подавали на

запам'ятовуючий осцилограф С8-13 або через аналого-цифровий перетворювач на ПЕОМ (максимальна частота запису даних дорівнювала 9,09 кГц).

Для здійснення комп'ютерного визначення параметрів кривих ІФХ були розроблені способи математичної обробки експериментальних даних. Момент досягнення рівня  $F_0$  визначали за допомогою мінімуму другої похідної (рис.1). Значення  $F_{pl}$  визначали як рівень сигналу у момент часу, який відповідає першому мінімуму на графіку першої похідної (рис.2). Використання похідних для аналізу кривих ІФХ дозволило ввести нові параметри - часові інтервали від початку освітлення до появи другого максимуму ( $T_{2max1d}$ ), другого ( $T_{2min1d}$ ) та третього ( $T_{3min1d}$ ) мінімумів на графіку першої похідної (див.рис.2 та рис.3). Ці екстремуми відповідають найбільшим швидкостям зміни флуоресценції під час основних індукційних переходів.

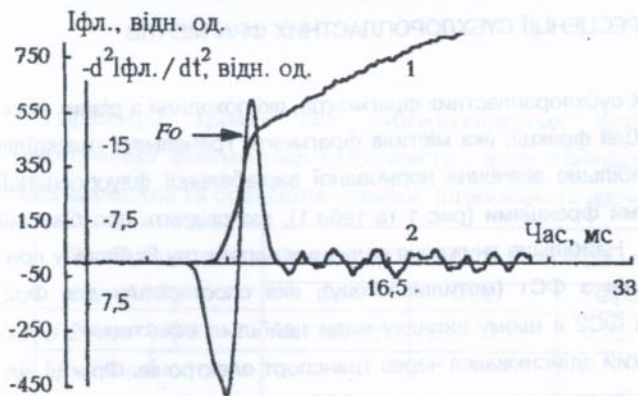


Рис.1 Крива ІФХ хлоропластів гороху (1) та графік другої похідної від неї (2).

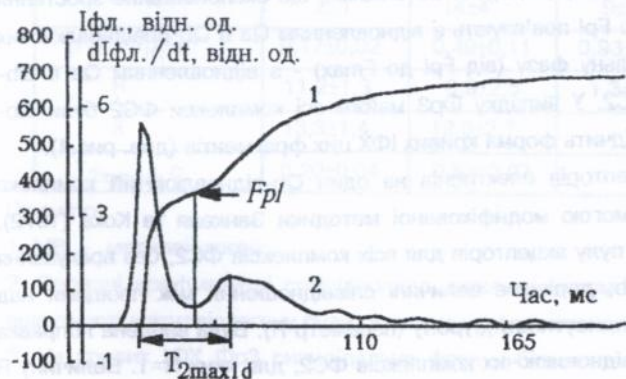


Рис.2 Крива ІФХ листка кукурудзи (1) та графік першої похідної від неї (2). Тривалість темної адаптації - 15 хвилин. Інтенсивність діючого світла -  $15 \text{ Вт/м}^2$ .

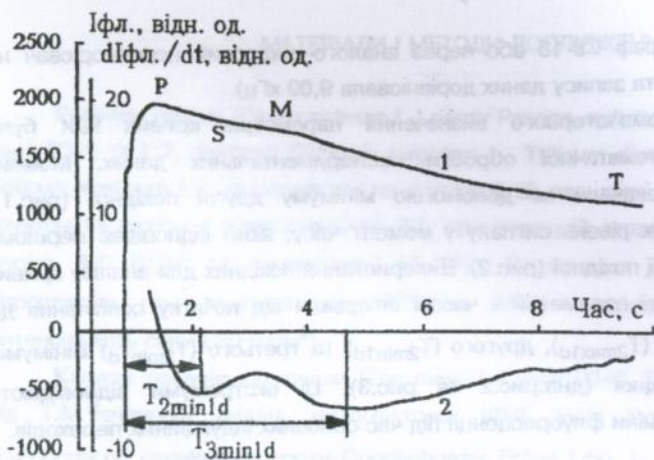


Рис.3 Крива повільної фази ІФХ листка кукурудзи (1) та графік першої похідної від неї (2). Інтенсивність діючого світла - 45 Вт/м<sup>2</sup>.

### ІНДУКЦІЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ СУБХЛОРОПЛАСТНИХ ФРАГМЕНТІВ

Були вивчені криві ІФХ субхлоропластних фрагментів, які походили з різних ділянок тилакоїдної мембрани. Для фракції, яка містила фрагменти гранальних тилакоїдів (Фр1), було характерне найбільше значення нормованої варіабельної флуоресценції ( $F_v/F_{max}$ ), порівняно з іншими фракціями (рис.4 та табл.1), що свідчить про більший вміст комплексів ФС2 у Фр1. Найбільше зниження величини параметру  $F_v/F_{max}$  у присутності акцептору електронів з ФС1 (метилвіологену), яке спостерігали для Фр2, вказує на те, що комплекси ФС2 в цьому випадку мали найбільш ефективний функціональний зв'язок з ФС1, який здійснювався через транспорт електронів. Фракції відрізнялись за вмістом Qb-невідновлюючих комплексів ФС2, відносну кількість яких оцінювали за допомогою параметру  $(F_{p1}-F_0)/F_v$ . Зауважимо, що експоненційне зростання рівня флуоресценції від  $F_0$  до  $F_{p1}$  пов'язують з відновленням Qa в Qb-невідновлюючих комплексах ФС2, а сигмоїдальну фазу (від  $F_{p1}$  до  $F_{max}$ ) - з відновленням Qa в Qb-відновлюючих комплексах ФС2. У випадку Фр3 майже всі комплекси ФС2 були Qb-невідновлюючими, про що свідчить форма кривих ІФХ цих фрагментів (див. рис.4).

Середню кількість акцепторів електронів на один Qb-відновлюючий комплекс ФС2 розраховували за допомогою модифікованої методики Занкеля та Кока (1972), згідно з якої середній розмір пулу акцепторів для всіх комплексів ФС2, без врахування їх здатності відновлювати Qb, дорівнює величині співвідношення між площами над кривими ІФХ у відсутності та присутності діурону (параметр R). Була введена поправка для врахування вмісту Qb-невідновлюючих комплексів ФС2, для яких  $R=1$ . Величину R для зразків, в яких містяться як Qb-відновлюючі, так і Qb-невідновлюючі комплекси

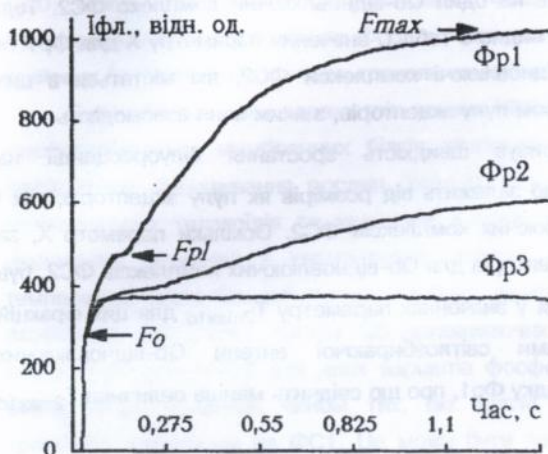


Рис.4. Криві ІФХ субхлоропластних фрагментів (А), нормовані за рівнем  $F_0$ . Інтенсивність діючого світла -  $5 \text{ Вт/м}^2$

Таблиця 1.

Параметри кривих ІФХ субхлоропластних фрагментів, отриманих після дигітонінової фрагментації хлоропластів гороху. Наведені середні арифметичні з 3-5 експериментів та стандартні похибки. Інтенсивність діючого світла -  $5 \text{ Вт/м}^2$

Параметри кривої ІФХ	Фракції субхлоропластних фрагментів			Хлоропласти
	Фр1	Фр2	Фр3	
$F_v/F_{max}$ (-МВ)	$0,77 \pm 0,02$	$0,55 \pm 0,11$	$0,23 \pm 0,05$	$0,78 \pm 0,01$
$\frac{F_v/F_{max} (-МВ) - (+МВ)}{(-МВ)} \cdot 100\%$	$2 \pm 1$	$14 \pm 4$	$9 \pm 3$	$10 \pm 4$
$(F_{p1} - F_0)/F_v$	$0,17 \pm 0,02$	$0,49 \pm 0,11$	$0,93 \pm 0,15$	$0,15 \pm 0,02$
R	$11,2 \pm 1,3$	$6,9 \pm 2,5$	$1,3 \pm 0,4$	$21,9 \pm 2,4$
X	$13,3 \pm 1,4$	$12,6 \pm 2,7$	-	$25,6 \pm 2,5$
$T_{2max1d}$ , c	$0,20 \pm 0,04$	$0,63 \pm 0,07$	-	$0,21 \pm 0,02$

Примітки:

1. МВ - метилвіологен.
2. Середні арифметичні співвідношень величин параметру  $F_v/F_{max}$  у присутності та відсутності метилвіологену були розраховані для кожного дослідження окремо.
3. На кривих ІФХ Фр3 сигмоїдальна фаза у більшості випадків була відсутня, тому параметри  $T_{2max1d}$  та X не визначали.

ФС2 можна виразити за допомогою рівняння:  $R=(FpI-Fo)/Fv+X(1-(FpI-Fo)/Fv)$ , де  $X$  - кількість акцепторів, що припадають на один Qb-відновлюючий комплекс ФС2. Тоді  $X=(R-(FpI-Fo)/Fv)/(1-(FpI-Fo)/Fv)$ . Як видно з табл.1, значення параметру  $X$  для Фр1 та Фр2 майже однакові, тобто, Qb-відновлюючі комплекси ФС2, які містяться в цих фракціях, не відрізняються за розміром пулу акцепторів, з яким вони взаємодіють.

Параметр  $T_{2max1d}$  характеризує швидкість зростання флуоресценції на сигмоїдальній ділянці кривої ІФХ, що залежить від розмірів як пулу акцепторів, так і світлозбираючої антени Qb-відновлюючих комплексів ФС2. Оскільки параметр  $X$ , за допомогою якого оцінювали пул акцепторів для Qb-відновлюючих комплексів ФС2, був однаковий для Фр1 та Фр2, різниця у значеннях параметру  $T_{2max1d}$  для цих фракцій може бути обумовлена розмірами світлозбираючої антени Qb-відновлюючих комплексів, яка була більшою у випадку Фр1, про що свідчить менша величина  $T_{2max1d}$  (див. табл.1).

Перевірка цього висновку була проведена шляхом використання розробленого нами способу порівняльної оцінки ефективного розміру світлозбираючої антени Qb-відновлюючих комплексів ФС2. Вивчали залежність величини  $1/T_{2max1d}$  від інтенсивності діючого світла ( $I_{cb}$ ) (рис.5). Величина коефіцієнту, яка визначає кут нахилу прямої  $1/T_{2max1d}=f(I_{cb})$  і залежить від розмірів світлозбираючої антени, була більшою для Фр1, порівняно з Фр2, що відповідає більшим розмірам світлозбираючої антени Qb-відновлюючих комплексів ФС2, які містились в цій фракції.

Субхлоропластні частинки з Фр3 були ідентифіковані як фрагменти міжгранальних тилакоїдів, тому що комплекси ФС2, які в них містились були Qb-невід-

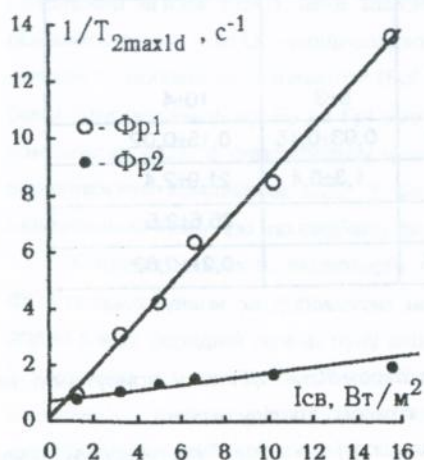


Рис.5. Залежність величини параметру  $1/T_{2max1d}$  від інтенсивності діючого світла для кривих ІФХ фракцій Фр1 та Фр2. Рівняння екстраполяційних прямих:

$$1/T_{2max1d}=0,260+0,350 I_{cb} \quad (r^2=0,96)$$

для Фр1;

$$1/T_{2max1d}=0,627+0,022 I_{cb} \quad (r^2=0,99)$$

для Фр2.

новлюючими, що характерно саме для міжгранальних тилакоїдів (Henrysson, Sundby, 1990). Оскільки характеристики комплексів ФС2 для Фр2 відрізнялись від таких для Фр1 (гранальних тилакоїдів) та Фр3, ці частинки було ідентифіковано як фрагменти крайових (маргінальних) ділянок гранальних тилакоїдів.

Були вивчені зміни параметрів кривих ІФХ фрагментів хлоропластів, обумовлені фосфорилюванням мембранних білків хлоропластів гороху та впливом підвищеної температури вирощування рослин (табл.2). В досліджах використовували фрагменти міжгранальних тилакоїдів та крайових ділянок гранальних тилакоїдів. Помічено, ці фрагменти, отримані з хлоропластів рослин, які вирощувались при підвищеній температурі, мали більший загальний вміст комплексів ФС2 порівняно з контрольним варіантом, при цьому частка Qb-відновлюючих ФС2 також збільшувалась. Зміни параметрів кривих ІФХ для двох варіантів фосфорилювання свідчать про збільшення вмісту ФС2, головним чином тих, які здатні відновлювати Qb та підтримувати транспорт електронів на ФС1. Це може бути пояснено міграцією комплексів ФС2 з даними характеристиками до експонованих в строму ділянок тилакоїдних мембран за

Таблиця 2.

Параметри індукційних кривих "легких" субхлоропластних фрагментів, отриманих з хлоропластів гороху після процедури фосфорилювання мембранних білків. Наведені середні арифметичні з 3-6 біологічних повторностей та стандартні відхилення.

Температура вирощування рослин	Варіант досліджу	Параметри індукційної кривої			
		Fv/Fmax у відсутності метилвіологену	Fv/Fmax у присутності метилвіологену	(Fpl-Fo)/Fv	R
15°C	контроль	0,11±0,01	0,11±0,01	1,00±0,10	1,0±0,2
	аеробне фосфорилювання	0,18±0,01	0,13±0,02	0,72±0,10	1,9±0,4
	анаеробне фосфорилювання	0,21±0,01	0,13±0,02	0,62±0,08	2,3±0,4
28°C	контроль	0,35±0,12	0,34±0,11	0,58±0,11	6,5±1,4
	аеробне фосфорилювання	0,47±0,10	0,42±0,09	0,49±0,10	9,6±0,3
	анаеробне фосфорилювання	0,48±0,09	0,42±0,09	0,48±0,11	7,5±1,2

Примітка.

Значення (Fpl-Fo)/Fv для варіанту з температурою вирощування рослин 15°C розраховані як співвідношення величин параметру Fv/Fmax у присутності та відсутності метилвіологену. Інтенсивність діючого світла - 5 Вт/м<sup>2</sup>

умов фосфорилювання мембранних білків хлоропластів. Якщо фосфорилювання здійснювали в анаеробних умовах, які посилюють включення міченого фосфору до білків комплексу ФС2 (Кочубей та інш., 1994), описані вище зміни параметрів кривих ІФХ були більш помітними.

Подібні результати отримані для фрагментів крайових ділянок гранальних тилакоїдів з хлоропластів мезофілу кукурудзи (лінії П346 та F7).

### КРИВІ ІНДУКЦІЇ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ ХЛОРОПЛАСТІВ

Було вивчено вплив фосфорилювання мембранних білків на параметри кривих ІФХ хлоропластів гороху та кукурудзи. За цих умов спостерігається зменшення  $F_v/F_{max}$  та збільшення  $(F_{pl}-F_0)/F_v$ . Завдяки порівнянню світлових кривих параметру  $1/T_{2max1d}$  індукційних кривих хлоропластів контрольного варіанту та варіанту з анаеробним фосфорилюванням з'ясовано, що умови фосфорилювання впливають на ефективний розмір світлозбираючої антени Qb-відновлюючих ФС2, зменшуючи його (рис.6). Це підтверджує гіпотезу про відокремлення фосфорилюваного СЗК2 від ФС2, яке може не супроводжуватись перетворенням Qb-відновлюючих комплексів ФС2 у Qb-невідновлюючі.

Вивчали зміни параметрів кривих ІФХ у відповідь на збільшення температури вирощування проростків гороху. Встановлено, що параметр  $(F_{pl}-F_0)/F_v$  був в 1,3 рази більшим у випадку, коли хлоропласти виділяли з рослин, вирощених при 28°C, порівняно з контролем (15°C).

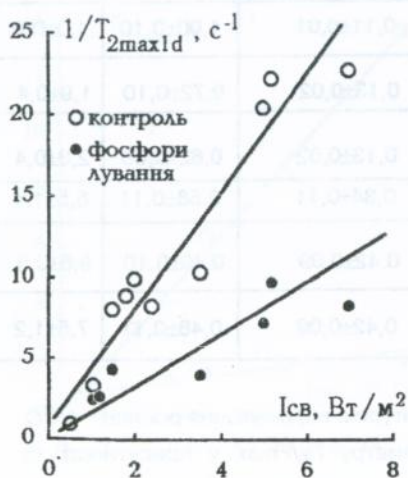


Рис.6. Залежність величини параметру  $1/T_{2max1d}$  від інтенсивності світла під час запису кривих індукції флуоресценції хлоропластів гороху. Рівняння екстраполяційних прямих:

$$1/T_{2max1d} = 1,06 + 3,48 I_{св} \quad (r^2 = 0,90)$$

для контрольного варіанту,

$$1/T_{2max1d} = -0,03 + 1,09 I_{св} \quad (r^2 = 0,80)$$

для варіанту з фосфорилюванням.

10-годинне витримування проростків кукурудзи, вирощених при 28°C, у кліматичних камерах при температурі 5°C також призводило до збільшення параметру  $(FpI-Fo)/Fv$ . Співвідношення <sup>дослід</sup> ~~контроль~~ / <sup>контроль</sup> ~~дослід~~ дорівнювало 1,8 для лінії П346 та 2,0 для лінії F7.

Зміни  $(FpI-Fo)/Fv$  при відхиленні температури вирощування від оптимальної, свідчать про збільшення вмісту Qb-невідновлюючих ФС2 в хлоропластах. Це може бути обумовлено безпосереднім впливом несприятливих умов на здатність комплексів ФС2 відновлювати Qb та (або) на функціонування реакцій циклу репарації ФС2, під час якого відбувається перетворення Qb-невідновлюючих комплексів ФС2 з пошкодженням білком D1 на Qb-відновлюючі.

Залежність параметру  $1/T_{2max1d}$  від інтенсивності діючого світла було використано для вивчення змін розмірів світлозбираючої антени Qb-відновлюючих ФС2 з хлоропластів мезофілу кукурудзи лінії П346 за умов зниження рівня освітленості при вирощуванні рослин ( $300 \text{ Вт/м}^2$  - контроль,  $30 \text{ Вт/м}^2$  - дослід). Співвідношення між коефіцієнтами, які визначають кути нахилу екстраполяційних прямих в <sup>дослід</sup> ~~контроль~~ дорівнювало 1,4, тобто розмір світлозбираючої антени Qb-відновлюючих ФС2 збільшується при затінненні.

### КРИВІ ІНДУКЦІЇ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ НАТИВНИХ ОБ'ЄКТІВ

Проведено аналіз кривих ІФХ калусів кукурудзи. Для дослідів використовували шматочки калусної тканини з рівномірним забарвленням (густо-зеленим для калусів ліній С455 та П346 та слабо-зеленим для П502). Виявилось, що для ліній з високою (С455) та середньою (П346) регенераційною здатністю величини параметрів  $Fv/Fo$ ,  $Fp/FI$  були більші, а параметру  $(FpI-Fo)/Fv$  - менші, порівняно з лінією П502, яка мала низьку регенераційну здатність та слабо розвинений фотосинтетичний апарат.

Встановлено, що криві ІФХ листків цибридних рослини томату з ознаками ядерно-цитоплазматичної несумісності відрізнялись від кривих ІФХ листків батьківських форм більшими значеннями параметру  $(FpI-Fo)/Fv$ . Це свідчить про порушення транспорту електронів від ФС2 до ФС1, вірогідно, за рахунок збільшення частки Qb-невідновлюючих ФС2.

Вивчено вплив світла високої інтенсивності на стан ФСА рослин пшениці різних сортів. Виявилось, що нові параметри, які базуються на розрахунку першої похідної від індукційної кривої ( $T_{2min1d}$  та  $T_{3min1d}$ ), в ряді випадків були чутливими до змін стану фотосинтетичного апарату за цих умов. В дослідях з експозицією рослин на світлі високої інтенсивності при різній температурі та складі повітря навколо листка встановлено, що відсутність  $CO_2$  та  $O_2$  більше посилює пошкодження ФСА, ніж

відсутність одного лише  $\text{CO}_2$  (табл.3). Це видно, головним чином, по зменшенню параметрів  $F_v/F_o$ , який відображує рівень фотохімічної активності ФС2, та  $F_p/F_t$ , що залежить від ефективності реакцій темної фази фотосинтезу. Параметри  $V_{\max}$  та  $t_{\min}$  (максимально можлива середня швидкість спаду інтенсивності флуоресценції та мінімальний час індукції при максимально можливій середній швидкості спаду флуоресценції, відповідно) характеризують здатність ФСА переходити із стану з мінімальним фотосинтезом та максимальною флуоресценцією у стан з максимальним фотосинтезом та певним стаціонарним рівнем флуоресценції (Нестеренко, Сідько, 1993). Величина  $V_{\max}$  зменшувалась, а  $t_{\min}$  збільшувалась в результаті експозиції на світлі високої інтенсивності, особливо за умов відсутності  $\text{CO}_2$  та  $\text{O}_2$  (див. табл.3).

Підвищення температури під час експозиції на світлі високої інтенсивності також спричиняло збільшення пошкодження ФСА проростків пшениці. При цьому реакція ФСА залежала від генотипу. Зменшення параметрів  $F_v/F_o$  та  $F_p/F_t$  у варіантах з підвищеною температурою ( $35^\circ\text{C}$ ) та (або) без  $\text{CO}_2$  по відношенню до контролю (експозиція на світлі високої інтенсивності при звичайному складі повітря та температурі  $25^\circ\text{C}$ ) було більш помітним для кривих ІФХ листків рослин пшениці сорту Білоцерківська 47 з низькою посухостійкістю, порівняно з Миронівською 808 та Одеською 117 з середньою та високою посухостійкістю, відповідно (табл.4).

Таблиця 3.

Вплив складу атмосфери на параметри кривої ІФХ листків проростків пшениці (*Triticum dicoccum* L.) під час експозиції на протязі 2,5 годин на світлі інтенсивністю  $400 \text{ Вт/м}^2$ . Наведені середні з 3 біологічних повторностей та стандартні відхилення. Інтенсивність діючого світла -  $100 \text{ Вт/м}^2$ .

Варіант досліджу	Параметри кривої ІФХ					
	$F_v/F_o$	$F_p/F_t$	$T_{2\min 1d}, \text{ c}$	$T_{3\min 1d}, \text{ c}$	$V_{\max}, \text{ c}^{-1}$	$t_{\min}, \text{ c}$
До експозиції	$1,06 \pm 0,24$	$4,2 \pm 0,3$	$7,5 \pm 0,7$	$40,0 \pm 2,8$	$0,019 \pm 0,001$	$54,3 \pm 4,1$
Після експозиції в звичайній атмосфері	$0,96 \pm 0,01$	$4,6 \pm 0,5$	$7,0 \pm 0,1$	$38,0 \pm 1,1$	$0,018 \pm 0,001$	$55,9 \pm 2,5$
Після експозиції в атмосфері без $\text{CO}_2$	$0,79 \pm 0,13$	$4,0 \pm 0,4$	$5,5 \pm 0,7$	$21,5 \pm 2,1$	$0,017 \pm 0,002$	$58,7 \pm 7,4$
Після експозиції в атмосфері без $\text{CO}_2$ та $\text{O}_2$	$0,08 \pm 0,01$	$1,7 \pm 0,3$	$22,5 \pm 3,5$	$92,5 \pm 3,5$	$0,007 \pm 0,002$	$145,2 \pm 31,4$

Таблиця 4.

Вплив складу повітря та температури навколишнього середовища на зміни параметрів кривої ІФХ листків проростків пшениці в результаті дії підвищеної інтенсивності освітлення ( $400 \text{ Вт/м}^2$  на протязі 4 годин). Інтенсивність діючого світла -  $100 \text{ Вт/м}^2$ .

Наведені середні з 3 біологічних повторностей та стандартні відхилення.

Сорт	Параметри кривої ІФХ	Варіант досліджу			
		Звичайне повітря		Повітря без $\text{CO}_2$	
		25°C	35°C	25°C	35°C
Білоцерківська 47	Fv/Fo	0,60±0,02	0,36±0,02	0,24±0,01	0,10±0,02
	Fp/Fi	4,24±0,31	3,16±0,60	2,24±0,17	2,14±0,13
Миронівська 808	Fv/Fo	0,79±0,01	0,61±0,07	0,09±0,01	0,15±0,02
	Fp/Fi	3,92±0,28	3,32±0,08	1,15±0,10	2,13±0,33
Одеська 117	Fv/Fo	0,45±0,01	0,47±0,07	0,16±0,01	0,19±0,02
	Fp/Fi	3,4±0,36	3,53±0,50	1,79±0,10	1,94±0,03

#### ВИСНОВКИ

1. Фосфорилювання мембранних білків хлоропластів гороху та кукурудзи призводить до збільшення частки Qb-відновлюючих комплексів ФС2 на експонованих у строму ділянках тилакоїдних мембран, що може бути спричиненим латеральною міграцією цих комплексів в умовах фосфорилювання їх поліпептидів.

2. Відхилення температури вирощування рослин від оптимальної (як її збільшення, так і зменшення) призводить до зростання частки Qb-невідновлюючих комплексів ФС2 в мембранах хлоропластів.

3. Неповний розвиток ФСА в калусних тканинах кукурудзи лінії П502 та наявність ядерно-цитоплазматичної несумісності в клітинах цибридних рослин томату супроводжуються підвищенням величини параметру  $(Fp-Fo)/Fv$ , який дає оцінку частки Qb-невідновлюючих комплексів ФС2.

4. Пошкодження ФСА, яке тестується по зменшенню параметрів Fv/Fo та Fp/Fi, є найбільшим за відсутністю вуглекислого газу та кисню в навколишньому середовищі під час експозиції рослин пшениці на світлі високої інтенсивності. Ступінь пошкодження зменшується за відсутністю одного лише вуглекислого газу та стає ще меншим при нормальному складі атмосфери.

5. Ступінь пошкодження ФСА рослин пшениці в результаті дії світла високої інтенсивності в умовах підвищеної температури та відсутності вуглекислого газу залежить від генотипу. Найбільше пошкодження ФСА спостерігається у рослин пшениці чутливих до посухи сортів.

## Список опублікованих основних праць за темою дисертації.

1. Кочубей С.М., Корнеев Д.Ю. Изменения вариабельной флуоресценции хлоропластов при фосфорилировании мембранных белков в анаэробных условиях // Физиология растений.-1994.-№1.-С.21-23.
2. Стасик О.О., Корнеев Д.Ю. Вплив високотемпературного стресу та дефіциту CO<sub>2</sub> на кінетику індукції флуоресценції хлорофілу в листках проростків різних за посухостійкістю сортів озимої пшениці // Доп. НАН України.-1996.-№1.-С.107-109.
3. Кочевенко А.С., Ратушняк Я.И., Корнеев Д.Ю., Стасик О.О., Шевченко В.В., Кочубей С.М., Сидоров В.А. Параметры фотосинтетического аппарата цитоплазматического гибрида культурного томата *Lycopersicon esculentum* с хлоропластами *L. peruvianum* var. *dentatum* // Доп. НАН України - 1997. - №2.-С.57-61.
4. Корнеев Д.Ю. Использование производных для анализа индукционных кривых флуоресценции хлорофилла // Физиология и биохимия культ. растений.-1997.-№2.-С.146-151.
5. Шевченко В.В., Корнеев Д.Ю., Дыкун М.О. Особенности формирования фотосинтетического аппарата в каллусных тканях различных инбредных линий кукурузы // Тезисы докл. V конференции молодых ученых "Актуальные проблемы физиологии растений и генетики".- Киев.- 1992.- С.7.
6. Корнеев Д.Ю. Аналіз форми кривих індукції флуоресценції хлорофілу за допомогою розрахунку похідних // Тези доп. I з'їзду Укр. біофізичного товариства.- Київ.- 1994.-С.125-126.
7. Порубльова Л.В., Корнеев Д.Ю. Вплив низької температури на стан фотосинтетичного апарату проростків кукурудзи різних генетичних ліній // Тези доп. міжнародної наради "Актуальні питання фізіології рослин в аспекті екологічних проблем України".- Чернівці.-1995.-С.44.
8. Куфрик Г.І., Корнеев Д.Ю., Шевченко В.В. Вивчення впливу фосфорилування мембранных білків на флуоресцентні характеристики субхлоропластних фрагментів кукурудзи // Тези доп. VI конференції молодих вчених "Актуальні проблеми фізіології рослин і генетики". -Київ.-1996. -С.11-12.
9. Корнеев Д.Ю., Порублева Л.В., Шевченко В.В. Исследование состояния фотосистемы 2 в субхлоропластных фрагментах, выделенных из разных участков тилакоидных мембран // Тезисы докл. VI конференции молодых ученых "Актуальные проблемы физиологии растений и генетики". - Киев.- 1996. -С.14-16.
10. Корнеев Д.Ю. Изменение функционального состояния фотосистемы 2 в различных участках мембранной системы хлоропластов гороха (*Pisum sativum*) при

повышении температуры выращивания // Тезисы докл. VI молодежной конференции ботаников.- Санкт-Петербург.- 1997.-С.55.

11. Корнеев Д.Ю., Порублева Л.В., Сытник С.К. Оценка размеров светособирающей антенны Qb-восстанавливающих ФС2 в различных субхлоропластных частицах // Тезисы докл. III симпозиума Российского общества физиологов растений "Физико-химические основы физиологии растений и биотехнология". - Москва.- 1997.-С.23.

Корнеев Д.Ю. Вивчення стану фотосинтетичного апарату за допомогою методу індукції флуоресценції хлорофілу.- Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.12 - фізіологія рослин.- Інститут фізіології рослин та генетики НАН України, Київ, 1997.

Дисертацію присвячено розробці нових підходів до вивчення стану фотосинтетичного апарату з використанням методу індукції флуоресценції хлорофілу. Запропоновані нові кінетичні параметри, визначення яких базується на розрахунку похідних від індукційних кривих. Розроблені підходи до оцінки розмірів світлозбираючої антени та пулу акцепторів для Qb-відновлюючих комплексів фотосистеми 2. Отримані характеристики функціонального стану фотосистеми 2 в субхлоропластних фрагментах, які походять з різних ділянок тилакоїдних мембран. Досліджені зміни цих характеристик за умов фосфорилювання мембранних білків хлоропластів. Вивчено вплив несприятливих умов навколишнього середовища та дефектів біосинтезу на стан фотосинтетичного апарату.

Ключові слова: фотосинтетичний апарат, індукція флуоресценції хлорофілу, фотосистема 2.

Корнеев Д.Ю. Изучение состояния фотосинтетического аппарата с помощью метода индукции флуоресценции хлорофилла.- Рукопись.

Диссертация на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.12 - физиология растений.- Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев, 1997.

Диссертация посвящена разработке новых подходов к изучению состояния фотосинтетического аппарата с использованием метода индукции флуоресценции

хлорофилла. Предложены новые кинетические параметры, определение которых основано на расчете производных от индукционных кривых. Разработаны подходы к оценке размеров светособирающей антенны и пула акцепторов для Qb-восстанавливающих комплексов фотосистемы 2. Получены характеристики функционального состояния фотосистемы 2 в субхлоропластных фрагментах, которые происходят из различных участков тилакоидных мембран. Исследованы изменения этих характеристик в условиях фосфорилирования мембранных белков хлоропластов. Изучено влияние неблагоприятных условий окружающей среды и дефектов биосинтеза на состояние фотосинтетического аппарата.

Ключевые слова: фотосинтетический аппарат, индукция флуоресценции хлорофилла, фотосистема 2.

Korniyev D.Yu. Studying the photosynthetic apparatus state by means of the method of chlorophyll fluorescence induction.- Manuscript.

Thesis for Ph.D. (Biology) by speciality 03.00.12 - Plant Physiology.- Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 1997.

The dissertation is devoted to the development of new approaches to studying the photosynthetic apparatus state by means of the method of the chlorophyll fluorescence induction. The new kinetic parameters, the determination of which is based on the calculation of the derivatives from the induction curves, have been proposed. The approaches to the estimation of the sizes of the light-harvesting antennae and the pool of the electronic acceptors for the Qb-reducing photosystem 2 complexes have been developed. The characteristics of the functional state of the photosystem 2 complexes in subchloroplast fragments originated from different regions of the thylakoid membrane have been obtained. Changes of these characteristics have been investigated under conditions when membrane proteins of chloroplasts are phosphorylated. The influence of the unfavorable environmental conditions and the defects of the biosynthesis on the photosynthetic apparatus state have been studied.

Key words: photosynthetic apparatus, chlorophyll fluorescence induction, photosystem 2.

---

Підписано до друку 03.11.97р. Формат 60х90/16.  
Ум. друк. арк. 1.0, Обл.-вид. арк. 0,8.  
Наклад 100. Зам. 285.

---

Відділ оперативної поліграфії  
Центру Міжнародної освіти  
227-12-75, 227-37-86

1.34.240

**AB 38.874**