

Биология

УДК 58.03+581.174+543.426

Дж. М. ДЖАВРՇՅԱՆ, Լ. Տ. ԳԱԲՐԻԵԼՅԱՆ

ВЛИЯНИЕ ПОСЛЕДЕЙСТВИЯ ВЫСОКИХ ТЕМПЕРАТУР НА
ПАРАМЕТРЫ МЕДЛЕННОЙ ИНДУКЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ
ХЛОРОФИЛЛА *a* ФОТОСИСТЕМЫ 2 ХЛОРЕЛЛЫ

Исследовалось влияние последействия высоких температур на кинетику медленной индукции флуоресценции хлорофилла *a* хлореллы. Прогревание водоросли при температурах выше 45⁰С вызывало уменьшение параметров Р и М индукционной кривой. Изменение этих параметров указывает на подавление активности фотосистемы 2. Фотосистема 1 более устойчива к действию повышенных температур. Полученные данные позволяют полагать, что о термочувствительности водорослей можно судить по изменениям индукционных кривых медленной флуоресценции у объектов, подвергнутых предварительной тепловой обработке. Характер изменений кинетической кривой может указывать на повреждение различных участков фотосинтетической цепи переноса электрона.

В настоящее время методы фотолюминесценции хлорофилла *a* фотосистемы 2 (ФС2) автотрофных организмов широко применяются для оценки функционального состояния фотосинтетического аппарата [1–3]. Это обусловлено тем, что параметры фотолюминесценции хлорофилла тесно связаны с первичными процессами фотосинтеза [1–3]. В частности медленная индукция флуоресценции (МИФ) хлорофилла отражает последовательность взаимосвязанных фотофизических и фотохимических процессов фотосинтеза [1, 4, 5].

Индукционные кривые флуоресценции состоят из ряда максимумов и минимумов, природа которых в основном установлена [1, 2, 4]. Они успешно применяются при исследовании влияния экстремальных факторов окружающей среды на первичные процессы фотосинтеза [6–11]. В связи с этим использование параметров МИФ является весьма перспективным для оценки структурно-функционального нарушения тилакоидных мембран зеленых микроводорослей.

Целью данной работы является исследование механизмов нарушения первичных процессов фотосинтеза микроводоросли хлореллы после действия высоких температур.

Объект и методы исследования. Объектом исследования служила одноклеточная зеленая водоросль *Chlorella pyrenoidosa* 82. Хлореллу выращивали на среде Тамия при комнатной температуре ($23-27^{\circ}\text{C}$) и естественном освещении ($500-800\text{лк}$). Для тепловой обработки применялся ультратермостат ТУ-1. Суспензию хлореллы одинаковой плотности и одинакового объема подвергали тепловому воздействию ($25-55^{\circ}\text{C}$ с интервалом в 10°C) в течение 15 мин. Затем объект адаптировали к комнатной температуре и регистрировали МИФ на флуориметро-фосфороскопической установке, разработанной автором [12]. Биологическая повторность опытов 5-кратная. Полученные данные подвергались статистической обработке.

Результаты и обсуждение. Нами было рассмотрено влияние последствия высоких температур на форму индукционных кривых, максимумы и их соотношения. Сравнение индукционных кривых флуоресценции хлореллы, подвергнутой действию различных температур, показывает, что действие высоких температур отражается на форме индукционной кривой (рис. 1). Как видно из рис. 1, кинетическая кривая индукции флуоресценции хлорофилла *a* контрольных интактных клеток хлореллы при 25°C в основном аналогична индукционной кривой зеленых растений (кр. 1) [1, 2]. В настоящее время установлено, что кинетические кривые индукции флуоресценции хлорофилла отражают состояние электрон-транспортной цепи фотосинтеза (ЭТЦ) [1-4, 8].

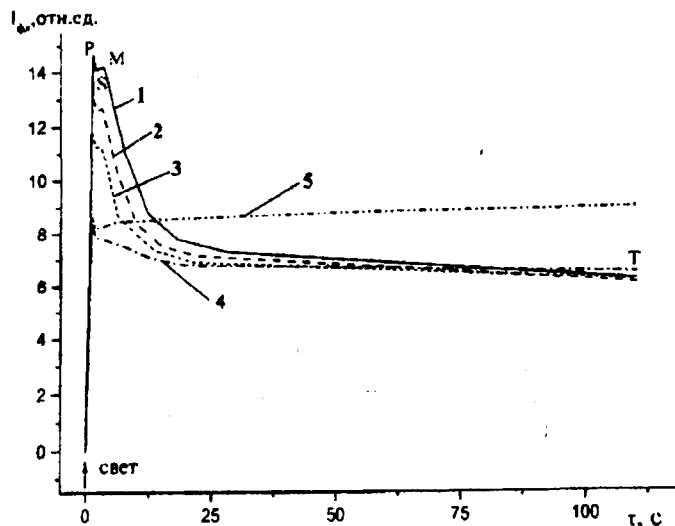


Рис. 1. Кинетические кривые индукции флуоресценции хлореллы после предварительного прогрева при 25° (1), 35° (2), 45° (3), 50° (4) и 55°C (5).

При освещении предварительно адаптированных к темноте фотосинтезирующих объектов интенсивность флуоресценции претерпевает ряд медленных P-S-M-T переходов (с максимумами P и M и минимумами S и T) [1-4]. После предварительной тепловой обработки суспензии водоросли (25-55°C) кривые индукции флуоресценции подвергаются значительным изменениям (рис. 1, кр. 2-5). При этом с повышением температуры в интервале 35-50°C происходит уменьшение максимумов P и M, что проявляется в течение τ от 0 до 5 сек. после включения возбуждающего света. Падение интенсивности максимума P в среднем составляет 41,3%, а максимума M - 54,7%.

Исследования последних лет установили природу P максимума и показали, что пик P связан с восстановлением первичного акцептора ФС2 Q_A , который принимает электрон от феофитина (ФФ) [1, 2, 4]. При полном восстановлении первичного хинона (Q_A^-) реакционный центр (РЦ) ФС2 переходит в закрытое состояние ($P_{680}^+ФФQ_A^-$). При последующем восстановлении РЦ ФС2 вследствие электростатического отталкивания перенос электрона от P_{680} на ФФ (ФФ $^-$) в присутствии Q_A^- не происходит. Благодаря этому энергия возбужденного РЦ (P_{680}^*) возвращается в антенну, вследствие чего уровень флуоресценции становится максимальным (пик P).

Из рис. 1 (кр. 2-5) видно, что с ростом температуры происходит уменьшение интенсивности максимального уровня P. Тушение флуоресценции в точке P можно объяснить термоиндуцированным нарушением работы ЭТЦ на уровне РЦ (P_{680}), первичного акцептора ФФ и первичного хинона Q_A , когда электрон переносится на хинон с образованием Q_A^- состояния ($P_{680}^+ФФQ_A^-$).

Появление на индукционной кривой второго максимума M связывают с циклическим/нециклическим электронным транспортом, соотношениями АТФ/АДФ, НАДФН/НАДФ $^+$ и величиной протонного градиента [1, 4, 7]. Падение уровня флуоресценции в точке M после температурного воздействия (35-50°C) составляет приблизительно 55%. Это можно объяснить не только вышеприведенными факторами, но и падением интенсивности максимума P. Данный процесс вызывается также нарушением работы водоразлагающего комплекса и пула пластохинонов, которые при нециклической ЭТЦ ответственны за создание протонного градиента на тилакоидной мембране [14]. Кроме того, возможно, имеет место нарушение работы ЭТЦ на участке P_{680} -ФФ- Q_A . Об этом свидетельствует изменение значений максимумов P и M и их соотношения. Последнее возрастает до 5,2% при температурах от 25 до 50°C (рис. 2). Но, как видно из рис. 2, при 55°C происходит заметное нарушение этой закономерности. Такое изменение соотношения P/M свидетельствует о том, что образование протонного градиента более чувствительно к тепловому воздействию, чем сам процесс восстановления Q_A .

Падение интенсивности флуоресценции при переходе P-S в литературе объясняется различными механизмами [1, 2, 4]. Уменьшение

интенсивности флуоресценции при переходе P-S связывают с фотохимическими и нефотохимическими процессами [1]. Фотохимическое тушение флуоресценции происходит при окислении первичного акцептора Q_A фотосистемой 1 (ФС1) [1], а нефотохимическое – связано с конформационными изменениями мембран, из-за которых происходит перераспределение энергии возбуждения между ФС2 и ФС1 по механизму спилловера [1, 13]. Причем, согласно современным представлениям, процесс перераспределения энергии между фотосистемами связывают с фосфорилированием белков светособирающего комплекса (ССК), в процессе которого участвуют ферменты протеинкиназа и протеинфосфатаза [13–15]. Результаты наших опытов указывают на то, что последствие высоких температур ($35\text{--}55^\circ\text{C}$) приводит к росту соотношения интенсивностей флуоресценции в точках P и S (F_p/F_s) приблизительно на 5% (рис. 2). Этот рост можно объяснить нарушением фотохимического тушения флуоресценции вследствие постепенной инактивации ФС1. Соотношение F_p/F_s указывает и на перераспределение энергии между фотосистемами. Рост этого отношения можно объяснить более резким изменением параметра S. Это свидетельствует о том, что процесс спилловера ингибируется быстрее, чем восстановление Q_A , вероятно, вследствие тепловой инактивации протеинкиназы и протеинфосфатазы.

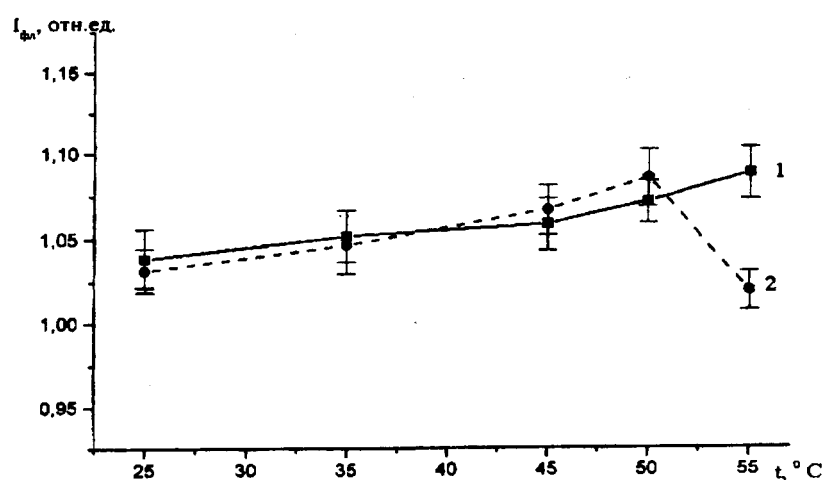


Рис. 2. Зависимость отношений параметров F_p/F_s (1) и F_p/F_m (2) от температуры предварительного прогрева.

Как уже указывалось выше, изменение интенсивности флуоресценции при переходе M-T зависит от циклического/нециклического электронного транспорта, соотношения АТФ/АДФ, НАДФН/НАДФ $^+$ и величины протонного градиента. Считается, что тушение флуоресценции на участке M-T вызвано усилением нециклического электронного транспорта [1].

Есть данные о корреляции между МТ-тушением флуоресценции и стационарной скоростью фиксации CO_2 [1,4,5].

Из рис. 1 видно, что падение интенсивности флуоресценции при переходе М-Т ($\tau=25-100\text{с}$) не подвергается заметному изменению при температурах $25-50^\circ\text{C}$ (кр. 1-4). Дальнейшее повышение температуры до 55°C приводит к росту уровня флуоресценции ($\tau=2-100\text{с}$), что отражено на кривой 5. При 100 сек. интенсивность уровня флуоресценции возрастает на 42,2%.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в области $25-50^\circ\text{C}$ наблюдается заметное нарушение стационарной скорости фиксации CO_2 , а также эффективности нециклического электронного транспорта. Возрастание уровня флуоресценции на участке М-Т при 55°C свидетельствует о возможном нарушении работы ФС1 и фиксации CO_2 . Таким образом, приведенные данные показывают, что повышение температуры приводит к постепенному ингибированию цепи электронного транспорта, а также нарушению работы ССК, ФС2 и ФС1.

Согласно авторам [1], степень ингибирования может быть оценена из сравнения F_p/F_t , F_m/F_t , где F_p , F_m и F_t – интенсивности флуоресценции в точках Р, М и Т кривой индукции флуоресценции.

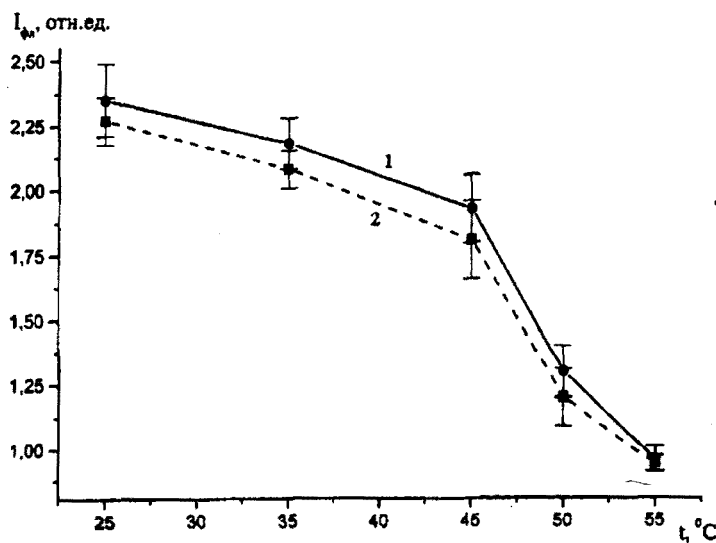


Рис. 3. Зависимость отношений параметров F_p/F_t (1) и F_m/F_t (2) от температуры предварительного прогрева.

Нами исследована температурная зависимость отношения F_p/F_t (см. рис. 3). Рост температуры сопровождается спадом отношения F_p/F_t приблизительно на 59%. Падение отношения F_p/F_t у хлореллы в зависимости от температуры соответствовало данным, полученным нами ранее при исследовании влияния высоких температур на цианобактерию *Spirulina* [11]. Отношение F_p/F_t у спирулины менялось менее резко: спад:

составлял 22,5%. Анализ кривых максимального и стационарного уровней индукции флуоресценции хлореллы показывает, что происходит непропорциональное изменение F_p и F_t . То есть, с одной стороны, падение уровня F_p , с другой – рост F_t обуславливают малую величину отношения F_p/F_t при высоких температурах.

Кроме того, проведен анализ отношения F_m/F_t (рис. 3), которое, согласно имеющимся литературным данным, связано с фотосинтетической активностью объекта [1, 5]. Отношение F_m/F_t у хлореллы уменьшается на 58,6% параллельно росту температуры. У спирулины же при росте температуры до 35°C наблюдалось повышение отношения F_m/F_t приблизительно на 2%, а при 55°C – падение на 14,4% [11].

Сравнение отношений параметров у хлореллы и спирулины показывает, что фотосинтетический аппарат первой является более термочувствительным, чем аппарат второй [11].

Таким образом, последствие высоких температур, сказывающееся на индукцию флуоресценции хлореллы, заключается в изменении формы кинетической кривой и ее максимумов. При этом разные участки индукционной кривой, отражающие включение того или иного компонента фотосинтетической ЭТЦ, имеют различную термочувствительность. Следовательно, участки ЭТЦ также обладают неодинаковой чувствительностью к высоким температурам. Сохранение в индукционной кривой флуоресценции хлореллы, прогретой до 45°C , довольно высокого уровня F_p свидетельствует о том, что наблюдается восстановление хинона (Q_A). То есть функционирование донорной части ФС2 происходит достаточно активно. Уменьшение интенсивности F_p при температурах выше 45°C свидетельствует об ослаблении донорной части ФС2, что препятствует фотовосстановлению Q_A . При температурах выше 50°C наблюдается замедление тушения флуоресценции на М–Т участке вследствие нарушения стационарной скорости фиксации CO_2 . Замедление тушения при переходе М–Т, возможно, происходит также из-за нарушения нециклического электронного транспорта. Таким образом, повышение температуры приводит к инактивации ЭТЦ и исчезновению второго максимума М. Пик М связывается с величиной протонного градиента на тилакоидной мембране [1]. Отсутствие пика М у прогретой при 55°C хлореллы свидетельствует о том, что вследствие инактивации реакционного центра (РЦ) ФС2 не могут обеспечиваться перенос электронов и, следовательно, существенное накопление протонов на мембране.

Таким образом, анализ полученных данных позволяет заключить, что исследование тепловой инактивации фотосинтетического аппарата хлореллы методом индукции флуоресценции хлорофилла указывает на повреждение РЦ ФС2 (при температурах $45\text{--}50^{\circ}\text{C}$). ФС1 при этом сохраняет функциональную активность. Дальнейшее повышение температуры (до 55°C) приводит к потере фотосинтетической активности вследствие инактивации и ФС1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Веселовский В.А., Веселова Т.В. Люминесценция растений. М.: Наука, 1990, 200 с.
2. Карапетян Н.В., Бухов Н.Г. – Физиология растений, 1986, т. 33, вып. 5, с. 1013–1026.
3. Гаевский Н.А., Моргун В.Н. – Физиология растений, 1993, т. 40, вып. 1, с. 136–145.
4. Иванов Б.Н. и др. – Там же, 1988, т. 35, вып. 2, с. 294–302.
5. Караваев В.А., Кукушкина М. А. – Биофизика, 1998, т. 43, вып. 6, с. 1130–1131.
6. Егорова Е.А., Бухов Н.Г. – Физиология растений, 2002, т. 49, вып. 5, с. 645–655.
7. Бухов Н.Г., Джибладзе Т.Г., Карапетян Н.В. – Физиология растений, 1987, т. 34, вып. 3, с. 435–444.
8. Franck F., Juneaub P., Popovic R. – BBA, 2002, v. 1556, p. 239–246.
9. Pospisil P., Skotnica J., Naus J. – BBA, 1998, v. 1363, p. 95–99.
10. Yamane Y. et al. – Photosynthesis Research, 1997, v. 52, p. 57–64.
11. Джавршян Дж. М., Габриелян Л. С. Материалы III респ. молод. конф. «XXI век: экологическая наука». Ер., 2002, с. 80–85.
12. Джавршян Дж. М. Первичные процессы фотосинтеза растений при загрязнении атмосферы и перспективы биофизического мониторинга: Автореф. дис. на соискание уч. ст. док. биол. наук. Минск, 1991.
13. Рубин А.Б. Биофизика. Т. 2. М.: Книжный дом “Университет”, 2000, 468 с.
14. Allen J.F., Bennet J. et al. – Nature, 1981, v. 291, p. 25–29.
15. Ebbert V., Godde D. – BBA, 1994, v. 1187, p. 335–346.

Ջ. Մ. ՃԱՎՐՇՅԱՆ, Լ. Ս. ԳԱՐՐԻԵԼՅԱՆ

ԲԱՐՁՐ ՋԵՐՍԱՍՏԻՃԱՆՆԵՐԻ ՀԵՏԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԲԼՈՐԵԼԱՅԻ
ՖՈՏՈՀԱՍՏԱԿԱՐԳ 2-Ի ԲԼՈՐՈՖԻԼ *a*-Ի ՖԼՈՒՈՐԵՍՑԵՆՑԻԱՅԻ
ԴԱՆԴԱՂ ԻՆԴՈՒԿՑԻԱՅԻ ՊԱՐԱՄԵՏՐԵՐԻ ՎՐԱ

Ամփոփում

Ուսումնասիրվել է բարձր ջերմաստիճանների հետազոտությունը բլորելայի բլորոֆիլ *a*-ի ֆլուորեսցենցիայի դանդաղ ինդուկցիայի կինետիկայի վրա: Ջրիմուռի տաքացումը (45°C -ից բարձր) առաջ է բերում ինդուկցիոն կորի P և M պարամետրերի անկում, ինչը մատնանշում է ֆոտոհամակարգ 2-ի ակտիվության նվազումը: Ֆոտոհամակարգ 1-ը ավելի կայուն է բարձր ջերմաստիճանների նկատմամբ: Նախապես ջերմային մշակման ենթարկված օբյեկտների դանդաղ ֆլուորեսցենցիայի ինդուկցիոն կորերի փոփոխությունները թույլ են տալիս ենթադրել ջրիմուռների ջերմազգայունության մասին: Կինետիկ կորի փոփոխությունների բնույթից կարելի է պատկերացում կազմել ֆոտոսինթետիկ էնկտրոն փոխադրող շղթայի տարբեր բաղադրամասերի վնասման մասին:

J. M. JAVRSHYAN, L. S. GABRIELIAN

AFTEREFFECTS OF HIGH TEMPERATURE ON THE PARAMETERS
OF SLOW INDUCTION OF PHOTOSYSTEM 2 CHLOROPHYLL *a*
FLUORESCENCE IN CHLORELLA

Summary

Aftereffects of high temperature on the kinetics of slow induction of chlorophyll *a* fluorescence were studied in Chlorella. Heating of alga at the temperature over 45°C caused decrease of induction curve parameters P and M. Changes of these parameters indicated a suppression of photosystem 2 activity. Photosystem 1 was more stable to the high temperature effect. The results suggest that an algae thermosensitivity may be evaluated by changes in the induction curves of slow fluorescence in the preheated objects. The pattern of changes in kinetic curves may indicate disturbances in particular sites of photosynthetic electron transport chain.