

ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ КСАНТОФИЛЛОВ ВИОЛАКСАНТИНОВОГО ЦИКЛА НА ПОЧВЕННУЮ ЗАСУХУ У ДВУХ КОНТРАСТНЫХ ПО ЗЕРНОВОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ СОРТОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

Г.А. Прядкина

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев, Украина

Введение

Актуальность работ по изучению влияния засухи на озимую пшеницу обусловлена масштабами и темпами изменений климата, то есть тем, что эта важнейшая зерновая культура все чаще произрастает в условиях дефицита влаги. Вызванное действием водного дефицита закрытие устьиц снижает количество поглощенной углекислоты и, тем самым, уменьшает использование части поглощенной световой энергии для ассимиляции CO_2 . Сокращение затрат энергии на фотохимические реакции в процессе фотосинтеза потенциально может привести к образованию свободных радикалов [1, 2]. Существуют разные механизмы защиты липидов мембран хлоропластов от деструкции формами активного кислорода [3]. К быстрым механизмам предупреждения фоторазрушения фотосинтетического аппарата относится механизм превращения избытка поглощенной энергии в тепло [4], в основе которого изменение доли эпоксицианина и дезэпоксицианина ксантофиллов в виолаксантиновом цикле (ВЦ) [1, 4]. Показано, что увеличение количества дезэпоксицианина пигмента зеаксантина связано с гашением избытка поглощенной энергии путем ее тепловой диссипации [5, 6]. Поэтому изучение светозависимых превращений пигментов виолаксантинового цикла в условиях водного дефицита имеет большое значение.

Целью данной работы было установление особенностей реакции пигментов ВЦ контрастных по зерновой продуктивности сортов озимой пшеницы на почвенную засуху.

Методы исследований

Исследования проведены на флаговых листьях двух контрастных по зерновой продуктивности сортов озимой пшеницы: интенсивного сорта Фаворитка и полунтенсивного сорта Мироновская 808, которые были выращены в 11-кг сосудах, в условиях оптимального минерального питания. В каждом сосуде выращивали 20 растений. Образцы для определения пигментов состояли из 6 флаговых листьев, повторность определений была трехкратной. В опытном варианте уровень влагообеспеченности почвы 30% от полной ее влагоемкости (ПВ) выдерживали в течение недели – с 27 мая по 4 июня 2009 г., после чего его восстанавливали до контрольного уровня – 60% ПВ. Реакцию пигментов ВЦ на почвенную засуху изучали на 2-х уровнях освещения: невысоком - $200 \text{ мкЭ/м}^2 \text{сек}$ - при отборе проб в утренние часы и высоком - $900 \text{ мкЭ/м}^2 \text{сек}$ - в послеобеденные. Интенсивность солнечной радиации измеряли с помощью люксметра Ю-116.

Для определения содержания пигментов отобранные из флаговых листьев выдержки как можно быстрее фиксировали в жидком азоте (-193°C) и сохраняли до проведения анализа в морозильнике при температуре -18°C . Затем их растирали в 4-6 мл 100% ацетона на холоде (доливая в образец несколько мл жидкого азота) с добавлением 20-30 мг углекислого магния. Потом, внося в центрифужные пробирки 40-50 мг бутилгидроксианизола, который препятствует окислению ксантофиллов, экстракты центрифугировали 2 минуты при 8 000 g. Полученную надосадочную жидкость разделяли на 2 пробы: первую из них использовали для определения содержания суммарного хлорофилла спектрофотометрическим методом [7], а вторую – ксантофиллов виолаксантинового цикла методом жидкостной хроматографии [8].

Содержание хлорофиллов *a* и *b*, а также общих каротиноидов рассчитывали по формулам [7]:

$$C_a = 9,78D_{662} - 0,99D_{644} \quad (1)$$

$$C_b = 21,426D_{644} - 4,65D_{662} \quad (2)$$

$$C_{car} = 4,695D_{440,5} - 0,268(C_a + C_b) \quad (3)$$

где C_a , C_b та C_{car} – соответственно, концентрация хлорофилла a , хлорофилла b и общих каротиноидов, а

D_{662} , D_{644} та $D_{440,5}$ – оптическая плотность растворов при длинах волн 662, 644 та 440,5 нм.

Ксантофиллов разделяли на жидкостном хроматографе высокого давления смесью ацетонитрила, метанола и дистиллированной воды в соотношении 70 : 9,6 : 3, по модифицированной методике Choudhury et al. [8]. Определения проводили на колонке 3x150 мм, заполненной Separon TM SG XC18 с размером частичек 5 мкм. Время выхода всех пигментов составляло 40-50 минут. Длина волны, при которой проводили определения, составляла 436 нм. Концентрацию ксантофиллов, мкг/дм², рассчитывали по формуле [9]:

$$C = C_s V_p / S V_k \quad (4)$$

где: C_s – концентрация отдельного ксантофилла, которая определяется по формулам, полученным по калибровочным кривым в зависимости от площади пика пигмента, мкг,

V_p – объем ацетона, добавленный при растирании образца, мкл;

S – площадь листовой высечки, дм²;

V_k – объем образца, впрыснутый в колонку, мкл.

Величину дезоксидации (ДЭ) виолаксантинового цикла рассчитывали как отношение:

$$ДЭ = (Z + 0,5 A) / (V + A + Z) \quad (5)$$

где V , A , Z – содержание виолаксантина, антраксантина и зеаксантина, соответственно.

Все результаты статистически обработаны [10].

Результаты и обсуждение

Поскольку объектами исследований были 2 контрастных по зерновой продуктивности сорта озимой пшеницы, то в табл. 1 представлены данные о влиянии недельной почвенной засухи на продуктивность этих двух сортов. Наибольшему сухой массой зерен на один побег как в контрольном, так и в опытном варианте отличался интенсивный сорт Фаворитка: его величина была в 1,3 и в 1,6 раз больше, чем у соответствующего варианта сорта Мироновская 808 (табл. 1). Продуктивность побега у первого сорта меньше снизилась под действием исследуемого фактора: в условиях засухи она составила 90, а у второго – только 72% от контроля.

Содержание суммарного хлорофилла на единицу площади флаг-листа, как и размер пула пигментов ВЦ на 7-ые сутки после начала засухи (табл. 2) у сорта Фаворитка был больше, чем у соответствующих вариантов сорта Мироновская 808. Эти данные подтверждают сделанный нами ранее вывод о том, что высокопродуктивные сорта озимой пшеницы отличаются большей величиной пула пигментов ВЦ на единицу площади листа [11]. Засуха снизила содержание тех и других пигментов в среднем в 1,3-1,6 раза у обоих сортов. В тоже время, величина пула пигментов ВЦ в фазу цветения в расчете на мг хлорофилла не отличалась ни между контрастными сортами, ни в вариантах с разными условиями влагообеспеченности: для всех вариантов он составлял около 70 мкг ксантофиллов на 1 мг хлорофилла.

Таблица 1. Элементы структуры урожая 2-х сортов озимой пшеницы в зависимости от условий влагообеспеченности почвы.

Сорт	Вариант	Сухая масса, г/побег		Сухая масса 1000 зерен, г	Количество зерен в колосе, шт.	Кхоз
		побега	зерен			
Фаворитка	60 % ПВ	4,01±0,12	2,12±0,06	47,0±1,0	45±1	0,53±0,01
	30 % ПВ	3,42±0,20	1,90±0,13	43,4±1,6	45±1	0,55±0,01
Мироновская 808	60 % ПВ	3,66±0,11	1,66±0,02	45,8±1,7	36±1	0,45±0,01
	30 % ПВ	2,68±0,11	1,20±0,05	35,2±0,2	34±2	0,45±0,01

Таблица 2. Влияние 7-дневной почвенной засухи на содержание пигментов во флаговом листе 2-х сортов озимой пшеницы в фазу цветения.

Влажность почвы, %ПВ	Интенсивность освещения, мкЭ/м²сек	Суммарный хлорофилл, мг/дм²	Пул пигментов ВЦ	
			мкг/дм²	мкг/мг хлорофил ла
	Мироновская 808			
30	200	4,8±0,6	318±45	66±9
	900	3,8±0,4	261±40	69±10
60	200	6,5±0,3	456±33	70±5
	900	6,0±0,6	418±58	70±10
	Фаворитка			
30	200	5,9±0,3	415±18	70±3
	900	5,2±0,2	359±29	69±6
60	200	7,4±0,3	510±20	69±4
	900	8,2±0,1	560±30	68±6

Известно, что превращения пигментов виолаксантинового цикла зависят от условий освещения: прямая реакция цикла - превращение виолаксантина в зеаксантин - происходит в условиях освещения, а обратная - зеаксантина в виолаксантин - в темноте. Поэтому содержание виолаксантина при низком уровне освещения было выше, чем при высоком, за исключением контрольного варианта сорта Фаворитка, у которого они достоверно не отличались (рис. 1). Однако последнее объясняется большим содержанием хлорофилла (8,2 мг/дм²) в пробах, отобранных в условиях яркого освещения, по сравнению с отобранными на низком его уровне (7,4 мг/дм²). Содержание зеаксантина, наоборот, увеличивается на ярком свете (рис. 2): с ростом интенсивности освещения от 200 до 900 мкЭ/м²сек количество зеаксантина на единицу площади флаг-листа возрастало в 1,3-1,5 раза у обоих сортов. Влияние засухи на содержание этого пигмента между сортами отличалось. У продуктивного сорта Фаворитка в контрольном и опытном вариантах и обоих уровнях освещения содержание зеаксантина было близким и колебалось, соответственно, от 44 до 46 мкг/дм² при невысоком уровне и от 60 до 64 - при высоком. У менее продуктивного сорта Мироновская 808 на уровне освещения 200 мкЭ/м²сек содержание зеаксантина в варианте с дефицитом влаги в почве уменьшилось в 1,3 раза, по сравнению с контрольным вариантом (с 60 до 47 мкг/дм²), а при 900 мкЭ/м²сек - еще выше в 1,6 раза (с 90 до 56). Таким образом, влияние почвенной засухи на пигментный аппарат менее продуктивного сорта выразилось в увеличении количества фотопротекторного пигмента - зеаксантина.

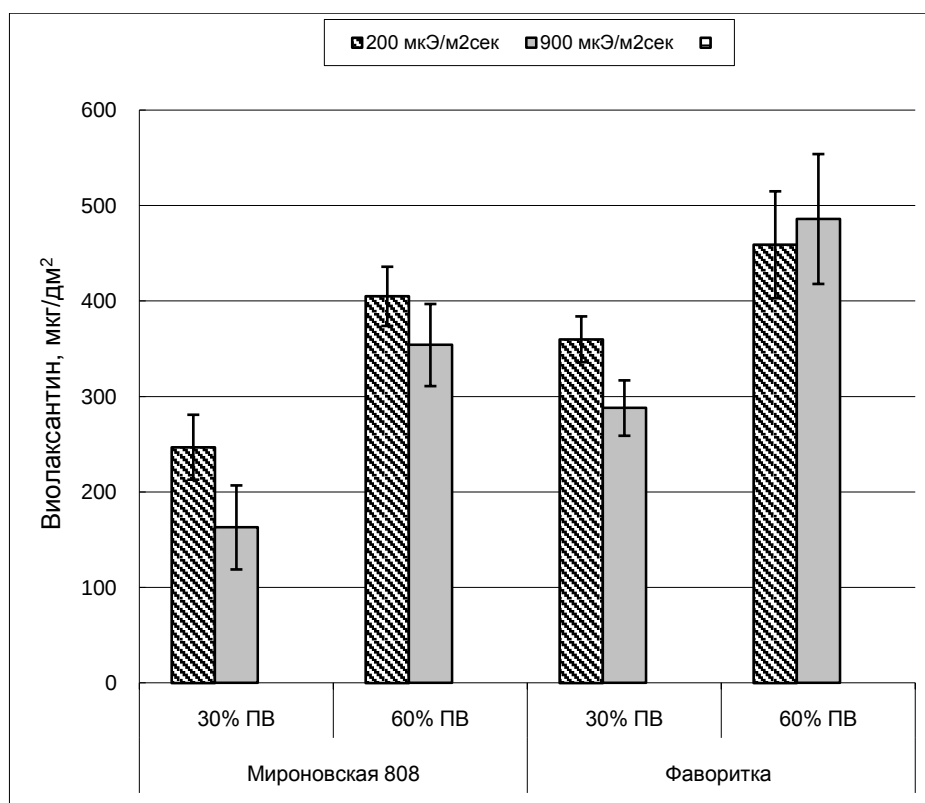


Рисунок 1 - Содержание виолаксантина во флаговом листе 2-х сортов озимой пшеницы при разных уровнях влагообеспеченности почвы и освещенности растений.

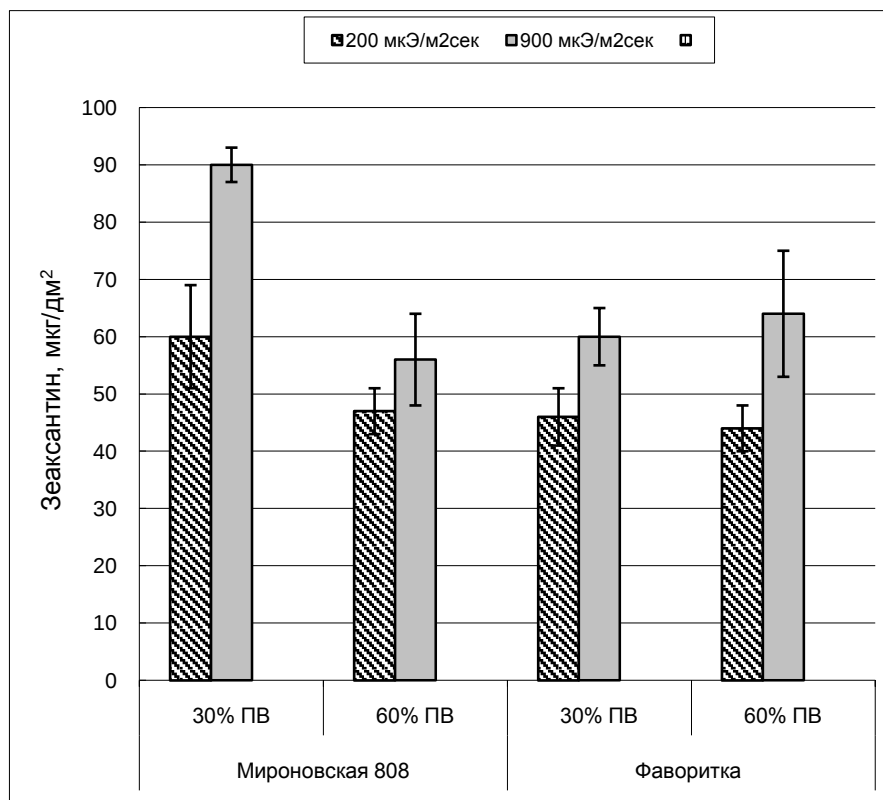


Рисунок 2 - Содержание зеаксантина во флаговом листе 2-х сортов озимой пшеницы при разных уровнях влагообеспеченности почвы и освещенности растений.

Хотя пул пигментов ВЦ в расчете на хлорофилл между контрастными сортами отличался недостоверно (табл. 2), изменчивость содержания отдельных ксантофиллов этого пула на единицу хлорофилла зависела от условий эксперимента. Как свидетельствуют данные таблицы 3, во флаговых листьях обоих сортов в контрольных вариантах содержание виолаксантина, также как и зеаксантина на мг хлорофилла не достоверно отличалось при изменении уровня освещения. В варианте с почвенной засухой количество виолаксантина у сорта Фаворитка снижалось с 61 до 55 мкг/мг хлорофилла, а у Мироновской 808 - с 51 до 43. Количество зеаксантина, соответственно увеличивалось: с 8 до 12 у первого сорта и с 12 до 24 - у второго. Влияние засухи на содержание фотопротекторного пигмента - зеаксантина - было достоверным у сорта Фаворитка только на ярком освещении, а у Мироновской 808 - на обоих его уровнях. Рост количества дезпоксицированных пигментов в общем пуле ВЦ в условиях засухи на обоих уровнях освещения у менее продуктивного сорта озимой пшеницы Мироновская 808 подтверждает и величина показателя дезпоксициции (ДЭ) виолаксантинового цикла во флаговом листе 2-х сортов озимой пшеницы в фазу цветения.

Таблица 3 - Влияние 7-дневной почвенной засухи на содержание отдельных пигментов и показатель дезпоксициции (ДЭ) виолаксантинового цикла во флаговом листе 2-х сортов озимой пшеницы в фазу цветения.

Влажность почвы, %ПВ	Интенсив- ность освещения, мкЭ/м ² сек	Пигменты ВЦ, мкг/мг хлорофилла			ДЭ
		виола- ксантин	антера- ксантин	зеаксантин	
		Мироновская 808			
30	200	51±5	1	12±3	0,20±0,04
	900	43±3	2	24±5	0,36±0,09
60	200	62±4	1	7±1	0,11±0,01
	900	59±5	2	9±2	0,14±0,04
		Фаворитка			
30	200	61±3	1	8±1	0,11±0,04
	900	55±2	2	12±2	0,18±0,03
60	200	62±6	1	6±2	0,09±0,01
	900	59±4	1	8±2	0,12±0,02

Таким образом, меньший, по сравнению с сортом Мироновская 808, размер доли дезпоксицированных пигментов в общем пуле ВЦ у Фаворитки свидетельствует о том, что в хлоропластах этого сорта меньшая часть поглощенной солнечной энергии расходуется на тепловую диссипацию. Следовательно, у интенсивного сорта озимой пшеницы скорость электронного транспорта выше (подтверждается устным сообщением Т.М. Шадчиной), чем у полунтенсивного сорта, что, в конечном итоге, может обусловить большую интенсивность фотосинтеза, сохраняющуюся в условиях засухи.

Выводы

В условиях засухи менее продуктивный сорт озимой пшеницы продуцирует большее количество фотопротекторного пигмента зеаксантина, как на единицу площади листа, так и на единицу хлорофилла.

Меньший, по сравнению с соответствующим вариантом сорта Мироновская 808, размер пула дезпоксицированных ксантофиллов ВЦ у сорта Фаворитка свидетельствует о большей скорости электронного транспорта у него даже в условиях недельной почвенной засухи. Таким образом, устойчивость зерновой продуктивности сорта озимой пшеницы

Фаворитка к снижению влажности почвы связана с устойчивостью его пигментного аппарата к таким условиям.

Список литературы

1. Demmig B., Winter K., Kruger A. et al. Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. A possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy // *Plant. Physiol.* – 1987. – 84, N2. – P. 218–224.
2. Loggini B., Scartazza A., Brugnoli E. et al. Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought // *Plant Physiology.* – 1999. – 119. – P. 1091–1100.
3. Шадчина Т.М., Гуляев Б.И., Кірізі́й Д.А. та ін. Регуляція фотосинтезу і продуктивність рослин. Фізіологічні та екологічні аспекти. – Київ: Український фітосоціологічний центр, 2006 р. – 383 с.
4. Horton P., Ruban A.V., Walters R.G. Regulation of light harvesting in green plants // *Annu. Rev. Plant Physiol. Biol.* -1996. - 47. - P. 655-684.
5. Affek H.P., Yakir D. Protection by against singlet oxygen in leaves // *Plant Physiol.* – 2002. – 129, N1. – P. 269-277.
6. Shadchina T.M., Pryadkina G.O. The light-induced deepoxidation of xanthophyll cycle pigments and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in leaves of spring wheat grown under the soil salinity and nitrogen deficiency // *Acta Physiologiae Plantarum.* - 2005. - 27, N4 supp.- P. 81-82.
7. Методы биохимического анализа растений.— Под ред. Полевого В.В.— Л.: ЛГУ, 1978. — 192 с.
8. Choudhury N. K., Choe H.T., Huffaker R.C. Ascorbate induced zeaxanthin formation in wheat leaves and photoprotection of pigment and photochemical activities during aging of chloroplasts in light // *J. Plant Physiol.* – 1993. - 141, N5. – P. 551-556.
9. Прядкина Г.А., Лихолат Д.А. Определение ксантофиллов методом жидкостной хроматографии в изократическом режиме // *Физиология и биохимия культурных растений.* - 2006. - 38, №1. - с. 75-82.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.
11. Прядкина Г.А., Дмитриева В.В. Генотипические отличия величины пула пигментов виолаксантинового цикла у сортов озимой пшеницы, отличающихся по зерновой продуктивности // Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений. Сборник научных трудов III Международной научной конференции 14-16 мая 2008 г., Минск. – Минск: Издательский центр БГУ, 2008. – С. 163-166.
12. Leenhardt F., Lyan B., Rock E. et al. C. Genetic variability of carotenoid concentration, and lipoxygenase and peroxidase activities among cultivated wheat species and bread wheat varieties // *European Journal of Agronomy.* - 2006. - 25. - P.170-176.