

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений**

ЦЕХАНОВИЧ
Ирина Андреевна

МОДИФИКАЦИЯ ПРОЦЕССОВ ФОТОСИНТЕЗА И СТРУКТУРЫ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ПРОРОСТКОВ ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE L.*) ПРИ СОЧЕТАННОМ ДЕЙСТВИИ ГИПЕРТЕРМИИ И СВЕТА

Аннотация дипломной работы

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Доманская Ирина Николаевна

Допущена к защите
«__»_____ 2021 г.
Зав. кафедрой клеточной биологии и
биоинженерии растений

Кандидат биологических наук,
доцент И.И. Смолич

Минск 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	4
РЕФЕРАТ	5
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Фитохромная система растений – структура, методы изучения, функции ..	10
1.2. Изучение структурно-функционального состояния пигментного аппарата при гипертермии.....	12
1.3. Активность перекисного окисления липидов как показатель стрессоустойчивости культурных растений.....	13
1.4. Влияние фитохрома на фотосинтетический аппарат в норме и в условиях стресса	15
1.5. Ксантофилловый цикл в высших растениях	18
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	21
2.1. Объекты исследования и условия их выращивания.....	21
2.2 Стрессовая и фитохромная обработки.....	21
2.3 Обработка ингибиторами белкового синтеза.....	21
2.4. Определение содержания фотосинтетических пигментов в листьях ячменя	22
2.5. Определение активности перекисного окисления липидов в листьях ячменя	22
2.6. Определение фотохимической активности ФСІ.....	23
2.7. Определение фотохимической активности ФСІІ.....	23
2.8. Определение хлорофилла и каротиноидов методом ВЭЖХ	24
2.9. Статистическая обработка данных.....	26
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	27
3.1. Влияние света разного спектрального состава на содержание фотосинтетических пигментов в проростках ячменя в нормальных физиологических условиях и при гипертермии.....	27
3.2. Исследование влияния света, адресованного фитохромам, на структурно-функциональное состояние фото-синтетического аппарата в зеленых проростках ячменя в условиях гипертермии.....	29
3.3. Влияние света разного спектрального состава на окислительный статус проростков ячменя в нормальных физиологических условиях и при гипертермии.....	33
3.4. Влияние света разного спектрального состава на структурно-функциональное состояние фотосинтетических мембран при онтогенетических	

изменениях листьев ячменя в нормальных физиологических условиях и при гипертермии	34
3.5. Исследование влияния системы фитохрома на функционирование ксантофиллового цикла в зеленых растениях ячменя при нормальных физиологических условиях и гипертермии	42
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	48
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	51

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ДКС – дальний красный свет

КС – красный свет

МДА – малоновый диальдегид

НТФ – нефотохимическое тушение флуоресценции

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ТШ – тепловой шок

УФ – ультрафиолет

ФСІ – фотосистема 1

ФСІІ – фотосистема 2

ХАФ – хлорамфеникол

ЦГ – циклогексимид

РЕФЕРАТ

Дипломная работа: 55 с., 8 рис., 12 табл., 50 источников.

Ключевые слова: ФИТОХРОМ, ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ, ГИПЕРТЕРМИЯ, ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПИГМЕНТЫ, КРАСНЫЙ СВЕТ, ДАЛЬНИЙ КРАСНЫЙ СВЕТ.

Объект исследования: зеленые и постэтиолированные проростки ячменя (*Hordeum vulgare* L.)

Цель исследования: установление роли ключевых фитохромов в регуляции структурно-функционального состояния фотосинтетического аппарата в растениях ячменя в нормальных условиях и при тепловом шоке.

Методы исследования: спектрофотометрия, метод определения перекисного окисления липидов, метод импульсно-модулируемой флуоресцентной спектроскопии, высокоэффективная жидкостная хроматография.

Полученные результаты и их новизна: В условиях ТШ (40°C в течение 2 ч) подавляется электронный транспорт как на донорной, так и на акцепторной стороне фотосистемы (ФС)2. Экспериментально показано регулирующее действие фитохрома в восстановлении нарушенного при тепловом шоке нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла ФСII и параметров флуоресценции ФСI. Использование в качестве модельной системы постэтиолированных проростков также подтвердило регуляцию фитохромных параметров индукции флуоресценции ФСII после стресса. Ингибирование синтеза белка на 70S и 80S рибосомах хлоропластов вызывало изменение структурно-функционального состояния ФСII, проявляющееся в значительном снижении всех основных параметров индукции флуоресценции хлорофилла, вплоть до полного прекращения функционирования ФСII. При частичном повреждении ФСII в результате ТШ, возможны репарационные процессы через фитохром-В-зависимую регуляцию функционального состояния ФСII. ВЭЖХ позволила установить различия в количественном, но не качественном соотношении пигментов при модификации фитохрома в интактных проростках ячменя после ТШ.

Область возможного практического применения: Результаты могут найти практическое применение при конструировании источников светодиодного освещения в закрытом грунте. Разработаны методические рекомендации по повышению стрессоустойчивости культурных растений (на примере ячменя), которые могут быть использованы как основа новых биотехнологий выращивания растений в защищенном грунте.

РЭФЕРАТ

Дыпломная праца: 55 с., 8 мал., 12 табл., 50 крыніц.

Ключавыя словы: ФІТАХРОМ, ФОТАСІНТЭТЫЧНЫ АПАРАТ, ГІПЕРТЭРМІ, ФОТАСІНТЭТЫЧНЫЯ ПІГМЕНТЫ, ЧЫРВОНАЕ СВЯТЛО, ДАЛЁКАЕ ЧЫРВОНАЕ СВЯТЛО.

Аб'ект даследавання: зялёныя і постэтыаліраваныя праросткі ячменю (*Hordeum vulgare* L.)

Цэль даследавання: усталяванне ролі ключавых фітахромаў у рэгуляцыі структурна-функцыянальнага стану фотасінтэтычнага апарату ў раслінах ячменю ў нармальных умовах і пры цеплавым шоку.

Метады даследавання: спектрафотаметрыя, метады вызначэння перакіснага акіслення ліпідаў, метады імпульсна-мадуляванай флуорэсцэнтнай спектраскапіі, высокаэфектыўная вадкасная храматаграфія (ВЭВХ).

Атрыманыя вынікі і іх навізна: Ва ўмовах ЦШ (40°C на працягу 2 гадзін) душыцца электронны транспарт як на донарным, так і на акцептарным баку фотасістэмы (ФС)2. Эксперыментальна паказана рэгулюючае дзеянне фітахрому ў аднаўленні парушанага пры цеплавым шоку нефотахімічнага тушэння флуарэсцэнцыі хларафіла ФСII і параметраў флуарэсцэнцыі ФСI. Выкарыстанне ў якасці мадэльнай сістэмы постэтыаліраваных праросткаў таксама падцвердзіла рэгуляцыю фітахромных параметраў індукцыі флуарэсцэнцыі ФСII пасля стрэсу. Інгібіраванне сінтэзу бялку на 70S і 80S рыбасомах хларапластаў выклікала змяненне структурна-функцыянальнага стану ФСII, якое выяўляецца ў значным зніжэнні ўсіх асноўных параметраў індукцыі флуарэсцэнцыі хларафіла, аж да поўнага спынення функцыянавання ФСII. Пры частковым пашкоджанні ФСII у выніку ЦШ, магчымы рэпарацыйныя працэсы праз фітахром-В-залежную рэгуляцыю функцыянальнага стану ФСII. ВЭВХ дазволіла ўсталяваць адрозненні ў колькасных, але не якасных суадносінах пігментаў пры мадыфікацыі фітахрома ў інтактных праростках ячменю пасля ЦШ.

Вобласць магчымага практычнага прымянення: Вынікі могуць знайсці практычнае прымяненне пры праектаванні крыніц святлодыёднага асвятлення ў закрытым грунце. Распрацаваны метадычныя рэкамендацыі па павышэнню стрэсаўстойлівасці культурных раслін (на прыкладзе ячменю), якія могуць быць выкарыстаны як аснова новых біятэхналогій вырошчвання раслін у абароненым грунце.

ANNOTATION

Degree paper: 55 p., 8 ill., 12 tab., 50 sources.

Key words: PHYTOCHROME, PHOTOSYNTHETIC APPARATUS, HYPERTHERMIA, PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS, RED LIGHT, FAR RED LIGHT.

Object of research: green and post-insulated barley sprouts (*Hordeum vulgare* L.)

Purpose of research: determination of the role of key phytochromes in the regulation of the structural and functional state of the photosynthetic apparatus in barley plants under normal conditions and under heat shock.

Research methods: spectrophotometry, method for determining lipid peroxidation, method of pulse-modulated fluorescence spectroscopy, high-performance liquid chromatography.

Obtained results and their novelty: Under HS conditions (40°C for 2 h), electron transport is suppressed on both the donor and acceptor sides of the photosystem (PS)2. The regulatory effect of phytochrome in restoring the non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence (PS2) and the fluorescence parameters (PS1) disturbed by heat shock has been experimentally demonstrated. The use of post-etiolated seedlings as a model system also confirmed the regulation of the phytochromic parameters of PS2 fluorescence induction after stress. Inhibition of protein synthesis on the 70S and 80S ribosomes of chloroplasts caused a change in the structural and functional state of PS2, which is manifested in a significant decrease in all the main parameters of the induction of chlorophyll fluorescence, up to the complete cessation of the functioning of PS2. In the case of partial damage to PS2 as a result of HS, repair processes are possible through the phytochrome-B-dependent regulation of the functional state of PS2. HPLC allowed us to establish differences in the quantitative, but not qualitative, ratio of pigments in the modification of phytochrome in intact barley seedlings after HS.

Area of possible practical application: The results can find practical application in the design of LED lighting sources in closed ground. Methodological recommendations for improving the stress resistance of cultivated plants (for example, barley) have been developed, which can be used as the basis for new biotechnologies for growing plants in protected soil.

ВВЕДЕНИЕ

Свет контролирует все стадии развития растений, начиная от прорастания семян и кончая процессами, лежащими в основе завершения их жизненного цикла. В растениях имеется множество датчиков, с помощью которых они способны улавливать и распознавать различные кванты света. Наиболее эффективным регуляторным действием обладает красный свет с длиной волны 650 – 680 нм. Сенсор, активирующийся при данном излучении, это фитохромная система. Физиологические изменения, которые возникают в растительном организме под воздействием этого облучения, известны достаточно давно. Красный свет контролирует прорастание семян, рост клеток, растяжение и развитие листа, цветение и многие другие процессы. Известно, что фитохром В в активной форме влияет на поддержание целостности хлоропласта и постоянного уровня хлорофилла.

Фитохромы – одни из наиболее хорошо изученных фоторецепторов, которые участвуют в процессах роста, фотоморфогенеза и различных биосинтезов и эта роль фитохрома достаточно хорошо изучена. В некоторых работах были опубликованы данные о влиянии фитохрома в тепловой устойчивости фотосинтетического аппарата. Среди абиотических факторов среды колебания температуры менее всего поддаются регуляции. На ранних этапах формирования фотосинтетического аппарата растений эти факторы могут быть критическими для выживания растений [47]. Однако количество опубликованных статей по данной теме мало и потому многие аспекты процесса регуляции стрессоустойчивости к гипертермии с помощью фитохромной системы остаются неясными.

Целью данной работы является изучение влияния света, адресованного фитохромам, на структурно-функциональное состояние фотосинтетического аппарата проростков ячменя при совместном действии гипертермии и света.

Для достижения поставленной цели были выдвинуты следующие задачи:

1. Изучить литературу, посвященную структуре и функциям фитохрома в растениях, а также влиянию фитохромной системы на структурно-функциональное состояние фотосинтетического аппарата при гипертермии.
2. Освоить биохимические и биофизические методы исследования состояния фотосинтетических мембран в растениях (метод спектрофотометрического определения фотосинтетических пигментов (хлорофиллов и каротиноидов), метод индукции флуоресценции хлорофиллов, перекисного окисления липидов, высокоэффективная жидкостная хроматография пигментов).
3. Установить качественные и количественные характеристики содержания фотосинтетических пигментов в проростках ячменя при гипертермии и последующей фитохромной обработки.

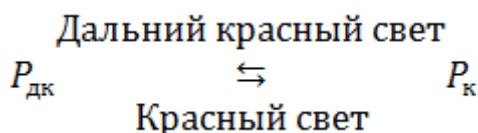
4. Изучить влияние света, адресованного разным формам фитохрома, на активность ФСІ, ФСІІ и окислительный статус мембран в проростках ячменя в нормальных физиологических условиях и при гипертермии.

5. Изучить влияние света разного спектрального состава на онтогенетические изменения в зеленеющих проростках ячменя в нормальных физиологических условиях и при действии ингибиторов белкового синтеза.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Фитохромная система растений – структура, методы изучения, функции

Фитохром – это фоторецептор, существующий в двух взаимопревращающихся формах, которые воспринимают дальний красный свет (ДКС) ($\lambda=730$ нм) и красный свет (КС) ($\lambda=660$ нм).



Фитохром встречается практически у всех растительных организмов, начиная от зеленых и красных водорослей и заканчивая высшими растениями. Активное изучение его строения и функционирования как одного из семейств фоторецепторов растений началось с 1952 г. после появления работ Borthwick Н. А. с соавторами. Благодаря последующим многочисленным исследованиям фитохром является хорошо изученной структурой фоторегуляторной системы [6].

Фитохром по своей структуре является димером белка, который имеет ковалентно связанную хромофорную группировку, состоящую из четырех пиррольных колец (А, В, С и D). Изначально молекула хромофора образуется как замкнутый тетрапиррол, после чего размыкается и встраивается в белок. У всех фитохромов имеются N-конец, на котором имеется консервативный домен, ковалентно связывающий фитохромобилин, и С-конец, отвечающий за передачу сигнала. Белок фитохрома водорастворим, так как в своем составе содержит примерно около 50% полярных аминокислотных остатков. Наиболее часто встречающимися аминокислотами являются аспарагин, глутамин, серин, аланин и лейцин. Как уже было упомянуто, фитохром существует в формах, способных к фотореверсии. Переход неактивной в активную форму фитохрома есть не что иное, как цис-транс-изомеризация хромофора с последующей перестройкой конфигурации апопротеина [14].

Различают фитохром А, В, С, D и Е. Фитохром А и В содержат большее количество белка, в отличие от форм С, D и Е, которые являются минорными. Спектр поглощения фитохрома А имеет более широкие пики, то есть он отвечает как за ответы на сверхнизкие интенсивности красного света, так и за высокоэнергетический ответ на дальний красный свет. В спектре поглощения фитохрома В пики более узкие и не способны заходить в область дальнего красного света. Благодаря такому различию спектра поглощения, растения способны отличать полную темноту, свет, обогащенный дальними красными квантами, и

освещение, пригодное для фотосинтеза [44]. По стабильности фитохром делят на две группы. К первому типу относят светонеустойчивый фитохром, который быстро разрушается при воздействии белого или красного света. Ко второму типу относят светоустойчивый фитохром, то есть остающийся стабильным на свету [14].

Для изучения локализации фитохрома в основном используются три экспериментальных подхода: спектрофотометрический (основанный на спектрально-избирательном поглощении квантов света), иммуноцитохимический (основан на антигенных свойствах фитохрома) и метод микрооблучения (основан на облучении отдельных клеток или их групп красным светом). Фитохром располагается практически во всех частях растений, с более высокой концентрацией в клетках меристемы. По расположению в клетке фитохром является цитоплазматическим белком, однако часть его располагается в ядре, концентрируясь в субъядерных структурах.

Фитохром регулирует ряд процессов протекающих в растениях. Эти процессы характеризуются общими свойствами:

1. процессы запускаются красным светом
2. действие красного света снимается действием дальнего красного света
3. эффекты красного и дальнего красного света фотообратимы
4. фитохром-зависимые процессы, как правило, подчиняются правилу доз – взаимозаменяемость интенсивности и времени облучения.

Световые сигналы, воспринимаемые фитохромным семейством светопоглощающих фоторецепторов, направляют рост и развитие растений на протяжении всего их жизненного цикла. Фитохром А активен на протяжении всего жизненного цикла растений. Он помогает растениям избегать затемнения. Улавливая большое количество ДКС растение получает сигнал о наличии более высоких соседей, однако рядом может быть свободный, не затемненный участок. Было также показано, что фитохром А также играет роль в восприятии длины дня, подавлении удлинения междоузлий и удлинения листьев у зрелых растений [29]. Содержание фитохрома А и В влияет на накопление антоцианов в листьях растений [22]. Фитохромы принимают участие в регуляции цветения [21]. Активная форма фитохрома обеспечивает в пластидах структурные предпосылки синтеза каротиноидов и хлорофилла [7].

Фитохром частично связан с мембраной, поэтому он может влиять на её проницаемость. Регулируя состояние мембран, фитохром тем самым изменяет направление метаболических процессов. Локальные воздействия фитохрома могут вызывать движения хлоропластов (фототаксис), накопление прохлорофиллида, наотические движения и много другое.

Фитохром влияет на всхожесть семян. КС индуцирует прорастание, а ДКС – тормозит его путем перевода активной формы фитохрома в неактивную [4]. Выпрямление гипокоты и увеличение размеров листьев у проростков так же контролируется фитохромом. Под влиянием света происходит подавление растяжения гипокоты, увеличение семядолей, дифференциация первичных листьев, развитие негативной геотропической реакции стебля.

В заключение этого пункта можно сказать, что фитохром представляет собой хромопротеид, состоящий из белка-носителя и хромофора. По своим физико-химическим свойствам его можно отнести к гидрофильным цитоплазматическим белкам [6].

1.2. Изучение структурно-функционального состояния пигментного аппарата при гипертермии

Общее состояние фотосинтетического аппарата, интенсивность процесса фотосинтеза, а также квантовый выход фотосистем зависит от воздействия факторов внешней среды. Одним из таких факторов является температура.

Наиболее уязвимыми при действии высоких температур оказываются процесс фотофосфорилирования и реакция Хилла, что влечет за собой снижение уровня содержания белка и нуклеиновых кислот, хлорофилла, фотохимической активности хлоропластов, разрывом целостности и усыханием мембран, нарушением углеводного, азотного и липидного метаболизма растений, а также инфицированием клеток микроорганизмами. Нарушения в метаболизме затрагивают фотосинтез и дыхание, что приводит к снижению активности процессов окислительного фосфорилирования и фотофосфорилирования. Циклическое фотофосфорилирование менее чувствительно к высоким температурам, чем нециклическое [25].

Частота и интенсивности воздействия на растение такого стрессора как гипертермия оказывает непосредственное влияние на состояние фотосистем растительного организма.

В фотосистеме 1 (ФСІ) происходит восстановление НАДФ⁺ до НАДФН, а в ФСІІ – фотолиз воды. Из работы Я.В. Середнева и др. известно [7], что ФСІ является чувствительной к острой гипертермии. ФСІІ устойчива к кратковременным стрессовым воздействиям, но при этом чувствительна к хронической гипертермии. Скорость реакции Хилла при гипертермии снижается, из чего следует, что интенсивность фотосинтеза и общее состояние фотосинтетического аппарата растений снижается.

При воздействии аномально высоких температур снижается концентрация хлорофилла и повышается содержание каротиноидов в клетке. На устойчивость растительных организмов к засухе и гипертермии [18], косвенно может

влиять соотношение суммы хлорофиллов и каротиноидов. Эти данные были получены в опытах О.В. Панфиловой, О.Д. Голяевой. Также важным показателем является соотношение содержания хлорофилла *a* и *b*. По этим показателю можно судить об устойчивости различных видов к стрессовым воздействиям, в частности, к повышенной температуре [30]. Хлорофилл *b* отличается большей устойчивостью к повышенной температуре, что может быть обеспечено, согласно некоторым экспериментам, более прочной связью в белок-пигментном комплексе, а также активностью таких ферментов как супероксиддисмутаза и пероксидаза при гипертермии.

Пигменты каротиноиды защищают хлорофилл от повреждения [27]. В работах Bjorkman O. было показано, что при повышенной освещенности и температуре наблюдается накопление молекул зеаксантина в результате дезоксидации виолаксантина при функционировании ксантофиллового цикла, что приводит к повышению стабильности тилакоидных мембран, препятствует резкому увеличению их проницаемости, защищает фотосистемы. В работе Bjorkman также было показано, что уровень дезоксидации виолаксантина коррелирует с устойчивостью аппарата фотосинтеза.

Из всего вышеперечисленного можно сделать вывод, что пигментный аппарат растений довольно активно реагирует на различные изменения температурного режима, в частности, на гипертермию. Так же предполагается, что пигменты принимают участие в формировании первоначальной приспособленности к воздействию стрессового воздействия.

1.3. Активность перекисного окисления липидов как показатель стрессоустойчивости культурных растений

Все живые организмы нашей планеты запасают энергию в анаболических, восстановительных процессах и высвобождают её в процессе окисления. Равновесие между метаболическими процессами контролируется окислительно-восстановительным потенциалом клетки или ее редокс-состоянием [30]. Одним из таких редокс-агентов являются активные формы кислорода (АФК). Примерами АФК, генерируемые во время метаболитных процессов, являются синглетный кислород ($^1\text{O}_2$), супероксидный ион ($\text{O}_2^{\cdot-}$), гидроксил ($\text{OH}^{\cdot}$), гидропероксил ($\text{OH}_2^{\cdot}$), озон (O_3). Наиболее распространенной активной формой кислорода является пероксид водорода (H_2O_2) [31]. В норме поддерживается равновесное состояние между генерацией АФК и их дезактивацией низкомолекулярными антиоксидантами или антиоксидантными ферментами, поскольку АФК одновременно могут выступать как в роли деструктивных агентов, так и сигнальных молекул [45]. Повышение уровня АФК может быть вызвано любы-

ми внешними воздействиями, что приводит к развитию деструктивных процессов.

Для образования пероксидных радикалов достаточно одного взаимодействия гидроксила с углеводородной цепочкой в различных участках молекулы, что приводит к образованию целого спектра пероксидов. Синглетный кислород может непосредственно взаимодействовать с полиненасыщенными жирными кислотами, приводя, к образованию пероксидов высших ненасыщенных карбоновых кислот. Время жизни синглетного кислорода в водной фазе низкое, поэтому его образование в тилакоидных мембранах приводит к существенным структурным повреждениям.

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) снижает текучесть мембраны, повышает вероятность перескока фосфолипидов из одного монослоя в другой, увеличивает утечку электролитов через мембрану, приводит к повреждению белков, инактивации рецепторов, ферментов и ионных каналов [33]. Одним из важнейших последствий, вызванных длительным окислением жирных кислот, является нарушение целостности мембраны в результате образования альдегидов и углеводов.

Важнейшим показателем ПОЛ является концентрация малонового диальдегида, который образуется при перекисном окислении линолевой ($C_{18}H_{32}O_2$) или арахидоновой ($C_{20}H_{32}O_2$) кислот. Его главной особенностью является способность связываться с мембранными белками, инактивируя ферменты и рецепторы.

АФК синтезируются главным образом в митохондриях, хлоропластах и пероксисомах, однако затем они могут транспортироваться и в другие органеллы клетки, обеспечивая редокс-регуляцию. Благодаря этому переносу ПОЛ может протекать в любой части клетки. Поэтому возникает предположение, что ПОЛ может являться одним из первых неспецифических звеньев в ответной реакции организма на стрессовое воздействие и может инициировать включение защитных механизмов.

В хлоропластах ПОЛ в стрессовых условиях протекает весьма активно, во-первых, из-за образования большого количества синглетного кислорода и пероксида водорода при нарушении функционирования электрон-транспортной цепи хлоропластов и из-за структурных особенностей липидного бислоя тилакоидных мембран [26]. Липиды фотосинтетических мембран представлены в основном четырьмя группами: дигалактозилдиацилглицеринами, сульфохинозилдиацилглицеринами, фосфатидилглицеринами и моногалактозилдиацилглицеринами [44]. Первые три группы липидов входят в состав липидного бислоя, в то время как моногалактозилдиацилглицерины в силу своих физико-химических свойств не способны формировать плоский бислой, так как в водной среде образуют инвертированные цилиндрические или сферические струк-

туры и согласно гипотезе, выдвинутой в [44], окружают пигмент-белковые комплексы, таким образом стабилизируя их структуру. Специфический липидный состав фотосинтетических мембран, включающих 75% электронейтральных галактолипидов, 15% фосфолипидов и 10% сульфолипидов с большим содержанием ненасыщенных жирных кислот, обуславливает высокий уровень текучести данных мембран [26]. Высокое содержание ненасыщенных жирных кислот обуславливает высокую скорость ПОЛ.

АФК вызывают перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот с образованием α,β -ненасыщенных альдегидов, таких как 4-гидроксиноненал и малонового диальдегида (МДА) [48]. Эти продукты рассматриваются в качестве маркеров окислительного стресса. Наиболее просто детектировать МДА. Спектрофотометрическая оценка уровня перекисного окисления липидов основывается на колориметрической реакции малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой. Поэтому подсчет конечных продуктов перекисного окисления липидов является одним из наиболее распространенных и точных методов оценки различных структурных повреждений растений [14].

Таким образом, измерение активности ПОЛ в проростках ячменя в нормальных физиологических условиях и при стрессовом воздействии в виде теплового шока (ТШ) позволит нам выявить уровни структурных повреждений в исследуемых растениях.

1.4. Влияние фитохрома на фотосинтетический аппарат в норме и в условиях стресса

Устойчивость к окислительному стрессу, вызываемому стрессовыми факторами среды, является одним из важных параметров, характеризующих состояние фотосинтетического аппарата. Ряд данных показывает, что повышение устойчивости к определенным стрессовым факторам может быть достигнуто путем увеличения содержания специфического фитохрома по сравнению с общим количеством всех фитохромов. Содержание фитохрома обычно зависит от соотношения красного и ДКС, достигающего растения. Увеличение отношения КС/ДКС сопровождается увеличением содержания фитохрома. Наибольшее увеличение содержания фитохрома наблюдается после кратковременного облучения красным светом ($\lambda_m = 620\text{--}670$ нм), ранее долгое время подвергавшихся воздействию темноты. Р.Н. Joshi с соавторами в своей работе показали, что длительное пребывание 7-дневных растений в темноте приводит к постепенной потере хлорофилла а и b [28]. Облучение светом с длиной волны не более 365 нм ускорило потерю хлорофиллов. Однако ускорение восстановления хлорофилла в результате УФ-А-облучения было частично устранено ежедневным 5-минутным облучением растений в течение семи дней низкой интенсивностью

КС, что увеличивало соотношение активной формы фитохрома к его общему числу.

Было доказано и подтверждено многими учеными, что фитохром участвует в ответе растений на КС, поскольку его действие было устранено последующим импульсом ДКС. Кроме того, ПОЛ было ускорено УФ-А-облучением, вероятно, из-за более высоких уровней активных форм кислорода и, как следствие, «обесцвечивания» хлорофилла. И наоборот, сочетание УФ-А-облучения с коротким освещением КС привело к снижению интенсивности ПОЛ и замедлило потерю хлорофилла. Облучение с помощью КС также уменьшило окисление белка, как в темноте, так и во время УФ-А-облучения. Это наводит на мысль, что высокий уровень фитохрома снижает чувствительность растений к окислительному стрессу. В ряде работ было выдвинуто предположение о реализации защитного механизма фитохрома посредством индукции синтеза антоцианов во время его образования, а также о зависимости накопленного количества антоцианов от общего содержания фитохромов [49].

Фотосистема 2 (ФСII) и система фиксации CO_2 являются ключевыми датчиками реакции растений на стрессовые факторы окружающей среды. Повышенное содержание фитохрома В приводит к повышенной устойчивости фотосинтетического аппарата растений. Многими исследователями было показано, что после предварительного освещения красным светом УФ-облучение не только уменьшает разрушение фотосинтетических пигментов, но также снижает уровень содержания H_2O_2 и замедляет уменьшение фотохимической активности ФСII под воздействием такого стресса. Длительное предварительное облучение (0,5–3 ч) листьев сразу после наступления темного периода с низкой интенсивностью красного света приводит к ускорению потери хлорофиллов *a* и *b*, а также каротиноидов, и снижению фотохимической активности фотосинтетического аппарата растений, облученных УФ светом.

Наибольшее соотношение КС/ДКС света наблюдается при действии сильного солнечного света в полдень, что непосредственно влияет на содержание фитохрома, в то время как утром это соотношение снижается из-за эффектов рассеяния атмосферы. На основе этого возникает вопрос о существовании механизмов, эффективность которых повышается, когда интенсивность света довольно низкая, а фитохромы находятся в неактивном состоянии. При слабом освещении недостаток активной формы фитохрома снижает активацию энергетически дорогой сети защиты от АФК и повышает общую эффективность установки. Предполагается, что увеличение содержания фитохрома вызывает повышение стрессоустойчивости фотосинтетического аппарата к УФ-облучению, высокой интенсивности света или тепла (холода). Очевидно, что оба фитохромы А и В важны для поддержания устойчивости к УФ-излучению. Так, например, дефицит фитохрома В приводит к заметному снижению содержания хло-

рофилла. Дефицит же фитохрома А мало влиял на содержание хлорофилла в тканях растений. Опосредованно фитохром В участвует в передаче сигнала, необходимого для развития хлоропластов, влияя на их количество, а также на систему гран и на мембрану хлоропластов.

В условиях стресса фотосинтетический аппарат растений имеет ряд защитных механизмов, индуцированных различными формами фитохрома. Превращение неактивной формы фитохрома в активную может активировать антиоксидантные ферменты, такие как каталаза и пероксидаза, и стимулировать образование антиоксидантов с низкой молекулярной массой, таких как каротиноиды и флавоноиды. Предполагается, что повышение антиоксидантной активности является одной из причин защитного и реактивирующего действия красного света на фотосинтетический аппарат растений, подвергающихся действию стрессоров. Также возможно, что антиоксидантные ферменты активируются напрямую, когда они поглощают свет в диапазоне 600–750 нм. Из-за поглощения света происходит изменение окислительно-восстановительных свойств молекул ферментов супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы.

Результаты Кочетовой Г.В. показывают, что на состояние устьичного аппарата влияет фитохром А и В. В частности, фитохром А вызывает открытие устьиц на красном и дальнем красном свете [13]. Фитохром В вызывает открытие устьиц на красном свете и закрытие на дальнем красном. Увеличение содержания фитохрома В может изменить проводимость устьиц. Таким образом, было показано, что более высокое отношение КС/ДКС, действующее через фитохром В, приводит к увеличению плотности устьиц и устьичного индекса в листьях *Arabidopsis thaliana*, что приводит к более интенсивной скорости фотосинтеза, увеличению поступления CO₂ и более эффективному использованию воды.

Кратковременный КС может замедлять старение листьев вследствие образования активной формы фитохрома, влияющей на биосинтез протеолитических ферментов, следовательно, замедляется деградация фотосинтетических пигментов и белков. Кроме того, фитохром В может регулировать развитие хлоропластов, влияя на количество хлоропластов и гран, а также на мембранную систему хлоропластов и восстановительной фазы ассимиляции углерода в фотосинтезе, как это было обнаружено в исследовании, изучающем влияние красного и дальнего красного облучения на активность комплекса 3-глицеральдегидфосфатдегидрогеназы в листьях проростков пшеницы [42].

Снижение содержания фитохромов сопровождается снижением устойчивости фотосинтетического аппарата. Вся фитохромная система, прежде всего фитохром В и фитохром А, является определяющим фактором в биосинтезе хлорофиллов. Изменения в системе фитохромов также приводят к быстрой регуляции экспрессии генов, кодирующих фотосинтетические белки, и антиокси-

дантных ферментов, которые изменяют свою активность. Фитохромы дополнительно взаимодействуют с компонентами сигнализации о стрессе и, как следствие, осуществляют тонкую регуляцию процессов фотосинтеза и устойчивости фотосинтетического аппарата к изменяющейся среде [49].

1.5. Ксантофилловый цикл в высших растениях

Как известно, каротиноиды являются природными органическими пигментами желтого, оранжевого или красного цвета, которые синтезируются в бактериях, грибах, водорослях, высших растениях. К каротиноидам относят каротины, ксантофиллы и некоторые продукты циклизации и потери части углеродного скелета ликопина. Наряду с выполнением функции антенны при фотосинтезе, каротиноиды играют важную роль в механизмах защиты фотосинтетического аппарата от различных повреждающих факторов окружающей среды [20,40]. Они защищают растения от перевозбуждения сильным светом, высвечивая избыток поглощенного света, разрушают АФК, образующиеся при фотоокислительном стрессе, и смягчают действие экстремальных температур. В основе их действия лежит их высокая неспецифическая реакционная способность и тропность к свободным радикалам.

Ксантофиллы – каротиноиды, содержащие кислород с общей эмпирической формулой $C_{40}H_{56}O_n$. Биологическое значение ксантофиллов связано с их способностью поглощать энергию солнечного света в коротковолновой части видимого спектра (380—520 нм). Наиболее значимыми представителями ксантофиллов являются зеаксантин, виолаксантин, лютеин и неоксантин.

От фотоокислительного стресса растение активно защищают как β -каротин реакционных центров ФСII, лютеин и неоксантин светособирающего комплекса, так и зеаксантин, образующийся в ходе ксантофиллового цикла (рисунок 1). Превращение виолаксантина в зеаксантин в ходе ксантофиллового цикла через антераксантин, катализируется виолаксантин-деэпоксидазой, активирующейся при различных стрессовых воздействиях. Известно, что на свету высокой интенсивности условием активации фермента является протонный градиент на тилакоидной мембране [39].

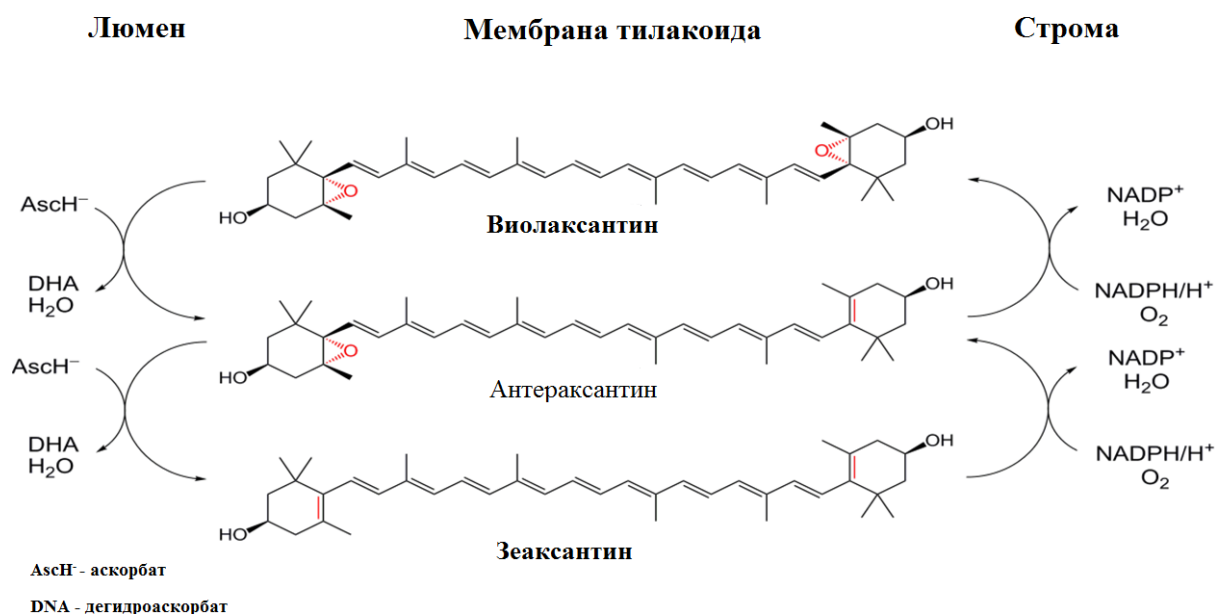


Рисунок 1 – Ксантофилловый или виолоксантиновый цикл в растениях

Наземные растения и эукариотические водоросли на сильном свете поглощают больше солнечной энергии, чем они могут использовать в процессе фотосинтеза, поэтому избыток энергии может приводить к фотоокислительным разрушениям мембран хлоропластов [16].

Ксантофилловый или виолоксантиновый цикл в высших растениях выполняет функцию защиты ФС аппарата от избытка энергии при повышенной инсоляции. Он позволяет избежать фотоингибирования, значительно увеличив нефотохимическое тушение. Цикл включает в себя ферментативные взаимопревращения между виолаксантином и зеаксантином (промежуточный продукт - антероксантин). Виолоксантиновый цикл протекает в минорных субъединицах светособирающего комплекса ФСII (белки CP29, CP26, CP23, CP22 и др.). При высокой интенсивности света вследствие активной работы электрон-транспортной цепи фотосинтеза происходит закисление люмена тилакоидов. При падении pH до 5 активируются фермент дезпоксидаза, которая с люменальной стороны мембраны осуществляет восстановление эпоксидных групп виолоксантна, используя в качестве восстановителя аскорбиновую кислоту. Двукратное восстановление приводит к образованию зеаксантина, который и выполняет фотопротекторную функцию.

При снижении интенсивности освещения, начинает преобладать обратная реакция, катализируемая эпоксидазой, расположенной со стромальной стороны мембраны с pH оптимумом 7,5. Для введения эпоксидных групп необходим молекулярный кислород и восстановитель (НАДФН). В результате образуется виолоксантин, который может выполнять роль светособирающего пигмента. Эта реакция является очень медленной по сравнению с дезпоксидацией. Для полной

эпоксидации зеаксантина до виолаксантина требуется от одного до нескольких часов.

Кроме того, показано, что ксантофилловый цикл способен включаться в регуляцию циклического электронного транспорта вокруг ФСII. Так было показано [40], что виолоксантин играет роль в передаче энергии электронного возбуждения от каротиноидов антенны к β -каротину реакционного центра ФСII. Также зеаксантин выполняет важную структурную роль в мембранах тилакоидов. При повышенном освещении ксантофиллы распределяются между светособирающими комплексами и липидным бислоем. Поскольку зеаксантин имеет две гидрофильные (-ОН) группы, он располагается поперек бислоя, тем самым увеличивая вязкость мембраны. Увеличение вязкости мембраны благодаря зеаксантину и некоторым терпеноидам (α -токоферол) снижает её проницаемость для кислорода и защищает липиды от перекисного окисления его активными формами. Таким образом, изучение активности виолоксантинового цикла методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в стрессовых условиях гипертермии с последующим освещением проростков светом, адресованным фитохрому, весьма интересно и требует тщательного изучения.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объекты исследования и условия их выращивания

В качестве объектов исследования использовали растения ячменя (*Hordeum vulgare* L.). Семена предварительно стерилизовали в течении двух часов в 0,1% растворе марганцовки. Растения выращивали в течение 5 дней в условиях 14-часового фотопериода ($120 \text{ мкмоль квантов м}^{-2}\text{с}^{-1}$) при температуре 22°C на водопроводной воде на сетках. Анализировали верхние участки листа ячменя длиной 3 см за вычетом верхушки (1 см).

2.2 Стрессовая и фитохромная обработки

Тепловую обработку интактных проростков проводили в термостате ТС-80М-2 в течение 2 ч при 40 °С в полной темноте.

Для перевода фитохрома в активную и неактивную формы зеленые проростки ячменя облучали красным светом с помощью светодиодных ламп с длиной волны 660 или дальним красным светом – с помощью светодиодных ламп 732 нм, либо последовательным сочетанием этих двух освещений. Интенсивность света измерялась с помощью фотометра FMA 2140 (Solar Light Company, США). Для КС интенсивность света была 1 Вт/м², а для ДКС – 2,5 Вт/м².

2.3 Обработка ингибиторами белкового синтеза

Для изучения биогенеза хлоропластных мембран применяли циклогексимид (ЦГ) – специфический ингибитор подавления деятельности 80 S-рибосом и хлорамфеникол (ХАФ) – известный как специфический эффектор 70 S-рибосом пластид и митохондрий [3]. Известно, что влияние ЦГ на образование Хл имеет интересную закономерность: при низких концентрациях антибиотика происходит стимулирование накопления пигмента, в то время как повышение концентрации вызывает торможение этого процесса [23]. Учитывая это, в наших экспериментах была выбрана высокая концентрация ЦГ (0,02 г/л).

Обрабатывали обоими ингибиторами белкового синтеза зеленые 5-дневные и постэтиолированные растения на корню, за сутки до стрессового воздействия ТШ. Через 24 ч и 48 ч пребывания на антибиотиках определяли содержание фотосинтетических пигментов в зеленых проростках и через 1, 6 и 24 ч зеленения – в постэтиолированных растениях.

2.4. Определение содержания фотосинтетических пигментов в листьях ячменя

Для экстракции пигментов используют высечки, либо отрезки из верхней трети листа длиной 1 см. Экстракцию хлорофиллов и каротиноидов осуществляют, растирая пробы в фарфоровой ступке в 99,5%-ном ацетоне с кварцевым песком и мелом. Раствор подвергают вакуумной фильтрации, с помощью колбы Бунзена, водоструйного насоса и фильтра Шотта. Объем экстракта фиксируется.

Количество пигментов в экстрактах определяют по спектрам поглощения на спектрофотометре при трех длинах волн: 662 нм, 644 нм и 440,5. Количество пигментов рассчитывают по формулам [16].

$$C_a = 9.784 \times E_{662} - 0.99 \times E_{644},$$

$$C_b = 21.426 \times E_{644} - 4.65 \times E_{662},$$

$$C_{\text{car}} = 4.695 \times E_{440,5} - 0.268 \times (C_a + C_b),$$

где C_a – концентрация хлорофилла *a*, мкг/мл;

C_b – концентрация хлорофилла *b*, мкг/мл;

C_{car} – концентрация каротиноидов, мкг/мл;

E – оптическая плотность при соответствующих длинах волн.

Содержание фотосинтетических пигментов выражают в расчете на единицу сырой биомассы листа.

2.5. Определение активности перекисного окисления липидов в листьях ячменя

ПОЛ тестируют по количеству МДА, содержание которого определяют спектрофотометрически по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой [2]. Растительный материал, массой 300 мг, гомогенизируют в 10 мл фосфатного буфера 0,005 М (рН 7,2 – 7,4), Полученный раствор профильтровывают через капрон, сливают в пробирку и доводят до 10 мл фосфатным буфером. В стеклянные пробирки отмеряют по 3 мл растительного гомогената в фосфатном буфере, делая три повторности. В одну пробирку наливают 3 мл фосфатного буфера для контроля. В каждую пробирку добавляют по 3 мл раствора 0,5% тиобарбитуровой кислоты в 20% трихлоруксусной кислоте. Полученные образцы нагревают на кипящей водяной бане в течение 20 минут, а затем охлаждают. Пробирки центрифугируют 10 минут при 5000 – 10000 об/мин, после осторожно сливая надосадочную жидкость.

Содержание МДА в надосадочной жидкости определяют по спектру поглощения, снятому при длине волны 532 нм. Также записывают показания не-

специфического поглощения при 630 – 650 нм. Величину экстинции ($\lambda 532$ нм – $\lambda 630$ нм) умножают на коэффициент 21,285 и получают содержание МДА в нмоль/мг свежего веса.

$$C_{\text{МДА}} = (6.456 \times E_{532} - 1.5 \times E_{600}) \times 21,285$$

где $C_{\text{МДА}}$ – концентрация МДА, нмоль/ мг свежего веса;

E – оптическая плотность при соответствующих длинах волн.

Содержание МДА представляют в расчете на г свежего веса.

2.6. Определение фотохимической активности ФСІ

Прижизненные измерения фотохимической активности ФСІ проводили на флуориметре «Dual-PAM-100» (HeinzWalz, Германия) с двухволновым (830/875 нм) модулем регистрации флуоресценции P700 (реакционного центра ФСІ) согласно [36, 37]. Рассчитывали параметры фотохимической активности ФСІ: эффективность функционирования ЭТЦ или скорости транспорта электронов (ETR) ФСІ, величину P_m , характеризующую максимальную флуоресценцию P700, эффективный квантовый выход ФСІ - $Y(1)$ и параметры квантовых выходов нефотохимического тушения ФСІ - $Y(ND)$ и $Y(NA)$, характеризующие донорные ($Y(ND)$) и акцепторные ($Y(NA)$) свойства P700.

2.7. Определение фотохимической активности ФСІІ

Активность ФСІІ определяли с помощью метода импульсно-модулируемой флуоресцентной спектроскопии (PAM, pulse-amplitudemodulatedfluorometry), позволяющей проводить прижизненную регистрацию кинетической кривой индукции флуоресценции Хл а. Измерения проводили на флуориметре «Dual-PAM-100» (Heinz Walz, Германия) по методу [37, 38].

Листья ячменя предварительно адаптировали к темноте в течение 20 мин. Затем возбуждали фоновую флуоресценцию хлорофилла F_0 измерительным светом низкой интенсивности ($0,04$ мкквантов $m^{-2} s^{-1}$, 460 нм), модулированным с частотой 20 Гц. При включении актиничного света (125 мкмоль квантов $m^{-2} s^{-1}$, 635 нм) интенсивность флуоресценции достигала максимальной величины F_m , затем снижалась за счет дезактивации по фотохимическому и диссипационному пути. Применение вспышки насыщающего света ($10\,000$ мкмоль квантов $m^{-2} s^{-1}$, 635 нм) на фоне действия актиничного света приводило к увеличению интенсивности флуоресценции с величины F_0 до F_m' . После вспышки насыщающего света выключается актиничный свет и включается источник дальнего красного света, возбуждающий только ФСІ. При этом пул переносчи-

ков электронов быстро и полностью окисляется. Величина флуоресценции достигает значения F_o' . По полученным значениям F_o , F_o' , F_m , F_m' и F рассчитывали величину максимального (потенциального) квантового выхода фотохимических реакций ФСII – (F_v/F_m) ; величину эффективного квантового выхода ФСII – $Y(\text{ФСII})$; квантовые выходы нерегулируемого – $Y(\text{NO})$ и регулируемого – $Y(\text{NPQ})$ нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла; коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла – q_N и NPQ , коэффициенты фотохимического тушения флуоресценции хлорофилла – q_P , показатель доли открытых реакционных центров – q_L [37, 43]:

$$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m,$$

$$Y(\text{ФСII}) = (F_m' - F)/F_m,$$

$$Y(\text{NO}) = 1 / (\text{NPQ} + 1 + q_L (F_m / F_o - 1)),$$

$$Y(\text{NPQ}) = 1 - \phi(\text{ФСII}) - \phi(\text{ФСII}),$$

$$q_N = (F_m - F_m')/(F_m - F_o'),$$

$$q_P = (F_m' - F)/(F_m' - F_o'),$$

$$q_L = (F_m' - F)/(F_m' - F_o') \cdot F_o' / F = q_P (F_o' / F)$$

Также рассчитывали эффективность функционирования электрон-транспортной цепи или скорости транспорта электронов (ETR) по [43].

2.8. Определение хлорофилла и каротиноидов методом ВЭЖХ

Навески растительного материала массой по 0,1г растирают до гомогената в фарфоровых ступках с добавлением 100 мг CaCO_3 и 0,5 мл 100% ацетона. Гомогенат переносят в эппендорфы объемом 2 мл. Гомогенат центрифугируют в течение 10 мин при 13000g. Супернатант переносят в новые эппендорфы. Если объем супернатанта менее 2 мл, то его доводят до 2 мл 100%-ным ацетоном. Перед хроматографией супернатант дополнительно центрифугируют в течение 10 мин при 13000g.

В вials для хроматографии вносят по 0,5 мл супернатанта и помещают их в камеру хроматографа. Хроматографическая колонка типа C18, размер частиц: 5 мкм, длина 15 см. Объем инъекции: 20 мкл. Разделение пигментов в ко-

лонке производится с использованием растворов А (90% ацетонитрила, 9,9% фильтрованной H₂O, 0,1% триэтиламина) и В (100% этилацетат) по программе (таблица 2.1) с потоком 0,5 мл/мин. Пигменты регистрируются детектором с диодной матрицей по спектрам поглощения в диапазоне 200-700 нм.

Таблица 2.1 – Программа изменения концентрации растворителя

Время, мин	Параметр	Значение
0,01	Концентрация р-ра В	0%
15,00	Концентрация р-ра В	100%
18,00	Концентрация р-ра В	100%
19,00	Концентрация р-ра В	0%
23,00	Концентрация р-ра В	0%
23,00	Остановка	

Для визуализации профиля хроматограммы выделяется спектр поглощения при 440 нм (рисунок 2). Площади пиков хроматограммы используются для количественного определения пигментов.

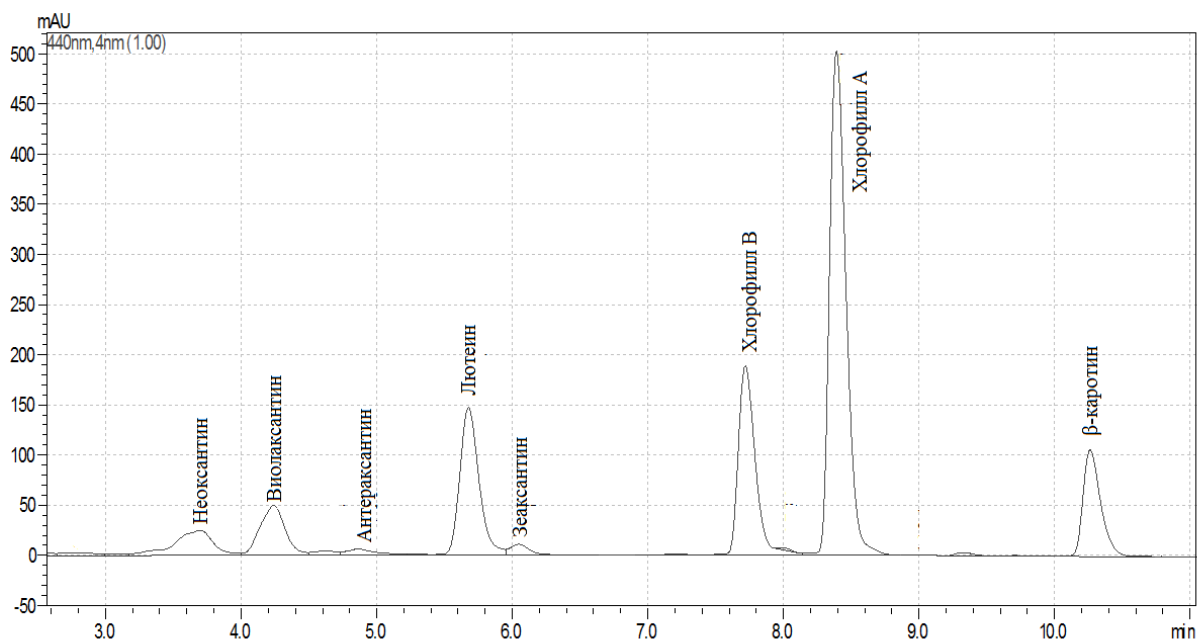


Рисунок 2 — Внешний вид хроматограммы и положение максимумов Хл *a*, *b* и каротиноидов при 440 нм.

Содержание пигментов рассчитывается по формуле [1]:

$$C_{\text{пигм}} = \frac{S_{440} \cdot F_{\text{пигм}} \cdot V}{V_{\text{инъекц}} \cdot m},$$

где $C_{\text{пигм}}$ – содержание пигмента (мкг/г сырой массы);

S_{440} – площадь пика поглощения при 440 нм;

$F_{\text{пигм}}$ – фактор для расчёта (Таблица 21.2);

V – объём супернатанта;

$V_{\text{инъекц}}$ – объём инъекции;

m – масса навески в г.

Таблица 2.2 – Последовательность выхода и факторы для хлорофилла и каротиноидов.

№	Пигмент	Фактор
1	Неоксантин	$65 \cdot 10^{-9}$
2	Виолаксантин	$44 \cdot 10^{-9}$
3	Антраксантин	$56 \cdot 10^{-9}$
4	Лютеин	$45 \cdot 10^{-9}$
5	Зеаксантин	$81 \cdot 10^{-9}$
6	Хлорофилл <i>b</i>	$182 \cdot 10^{-9}$
7	Хлорофилл <i>a</i>	$189 \cdot 10^{-9}$
8	β -каротин	$88 \cdot 10^{-9}$

2.9. Статистическая обработка данных

Для статистической обработки экспериментальных данных и учета полученных результатов использовали стандартные пакеты программ «Excel 2016», «SigmaPlot 12.0» и статистические методы, принятые в области биологических исследований. Статистическая обработка данных состояла в определении средней квадратичной ошибки их среднего. Приведены средние значения из 3-х биологических экспериментов и их стандартные ошибки.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Влияние света разного спектрального состава на содержание фотосинтетических пигментов в проростках ячменя в нормальных физиологических условиях и при гипертермии

Содержание фотосинтетических пигментов (Хл *a*, Хл *b* и каротиноидов) в пересчете на сырую массу 5-дневных листьев ячменя, растущих в нормальных физиологических условиях и при гипертермии, определяли с использованием спектрофотометрического метода. В таблицах 3.1 и 3.2 представлены данные такого эксперимента, проведенного в трехкратной биологической повторности. Установлено, что ТШ (42°C) в течение двух часов приводит к незначительному уменьшению содержания основных фотосинтетических пигментов – Хл (таблица 3.1), и практически не сказывается на содержании защитных желтых пигментов – каротиноидов (таблица 3.2). Так суммарное содержание Хл ($a + b$) в «шокированных» проростках составило 96,8% по сравнению с контролем. В нашем эксперименте зарегистрировано хоть и не столь явно выраженное, но «классическое» уменьшение содержания фотосинтетических пигментов под действием такого стрессора как ТШ. Наблюдаемое уменьшение содержания хлорофиллов в большей степени связано с разрушением Хл *a*, чем Хл *b*. Другими словами, при гипертермии в первую очередь подвержены деградации пигменты реакционных центров, а не светособирающих систем.

Для изучения влияния КС и ДКС на устойчивость к гипертермии 5-дневные проростки ячменя были подвергнуты ТШ (42°C) в течение двух часов. После чего их подвергли различному освещению. Обработка КС в течение 10 мин и затемнение на 20 мин для прохождения биосинтетических процессов «шокированных» проростков ячменя привело к уменьшению содержания Хл ($a + b$) (на 7% по сравнению с растениями после ТШ и на 10% по сравнению с контрольными проростками). В таком варианте опыта затрагивался и синтез желтых пигментов - каротиноидов, который также был уменьшен на 10% по сравнению как с «шокированными», так и с контрольными проростками. В растениях после стресса, освещенных только лишь ДКС в течение 20 мин с последующим 20-минутным затемнением, зарегистрированы уровни содержания как хлорофиллов, так и каротиноидов, характерные для контрольных проростков.

Таблица 3.1 – Влияние фитохромной системы на содержание хлорофилла в 5-дневных проростках ячменя в нормальных физиологических условиях и при гипертермии

Варианты опыта	Содержание Хл <i>a</i> , мг/г сырой массы	Содержание Хл <i>b</i> , мг/г сырой массы	Содержание Хл (<i>a</i> + <i>b</i>), мг/г сы- рой массы
1. Контроль	0,914±0,077	0,333±0,026	1,247±0,103
2. 2ч ТШ 2 ч при 42°C	0,877±0,083	0,331±0,032	1,208±0,115
3. 2ч ТШ → 10 мин КС → 20 мин ДКС	0,820±0,017	0,358±0,005	1,178±0,021
4. 2ч ТШ → 10 мин КС → 20 мин тем- нота	0,805±0,055	0,323±0,012	1,128±0,067
5. 2ч ТШ → 20 мин ДКС → 20 мин тем- нота	0,869±0,032	0,358±0,007	1,228±0,039

Таблица 3.2 – Влияние фитохромной системы на содержание каротиноидов в 5-дневных проростках ячменя в нормальных физиологических условиях и при гипертермии

Варианты опыта	Содержание каротиноидов, мг/г сырой массы
1. Контроль	0,254±0,022
2. 2ч ТШ 2 ч при 42°C	0,251±0,021
3. 2ч ТШ → 10 мин КС + 20 мин ДКС	0,219±0,007
4. 2ч ТШ → 10 мин КС → 20 мин темнота	0,229±0,017
5. 2ч ТШ → 20 мин ДКС → 20 мин темнота	0,242±0,011

Таким образом, проведенные эксперименты еще раз подтвердили имеющиеся в литературе и работах Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси сведения об уменьшении содержания фотосинтетических пигментов под действием такого стрессора как гипертермия (ТШ при 42°C в течение двух часов). При этом впервые обнаружено регулирующее действие фитохромной системы на содержание фотосинтетических пигментов зеленых проростков ячменя, подвергнутых ТШ [10]. Поскольку биосинтез хлорофилла является многоступенчатым процессом, возможно необходимо дополнительное, более длительное, чем 20 минут, время после освещения КС и ДКС для проявления изменений в содержании фотосинтетических пигментов.

3.2. Исследование влияния света, адресованного фитохромам, на структурно-функциональное состояние фотосинтетического аппарата в зеленых проростках ячменя в условиях гипертермии

Для изучения изменений структурно-функционального состояния фотосинтетического аппарата под действием внешних факторов широко используется флуоресценция Хл. Особенно важным обстоятельством является возможность непосредственного изучения параметров флуоресценции в интактных листьях. Из литературы известно, что одной из первичных мишеней действия высоких температур в цепи электронного транспорта являются кислород-выделяющий комплекс и ФСII. В связи с этим для оценки фотохимической активности ФСII использовали метод РАМ, позволяющий проводить прижизненную регистрацию кинетической кривой индукции флуоресценции Хл а. Зеленые 5-дневные листья ячменя дополнительно адаптировали к темноте в течение 20 мин для аппаратной регистрации, затем регистрировали индукционные кривые и рассчитывали параметры индукции флуоресценции (контроль). Часть растений с корнями подвергали ТШ в термостате (3 ч, 40°C), после которого листья освещали 20 мин КС с $\lambda=660$ нм (интенсивность 3,7 Вт/м²), либо только ДКС (интенсивность 7,0 Вт/м²), после чего регистрировали индукционные кривые (таблица 3.3).

Таблица 3.3 – Параметры индукции флуоресценции хлорофилла ФСII в 5-дневных проростках ячменя, адаптированных к темноте в течении 9 ч (ночной период, а затем подвергнутых ТШ в течении 3 ч, 40°C с последующим освещением КС и ДКС

Параметр	Контроль, темнота 9 ч	ТШ 3 ч, 40°C	КС 10 мин	КС 20 мин	ДКС 20 мин
1	2	3	4	5	6
Fv/Fm	0,813±0,014	0,752±0,007	0,777±0,002	0,771±0,005	0,778±0,002
Y(ФСII)	0,700±0,001	0,668±0,002	0,676±0,007	0,658±0,001	0,684±0,004
Y(NO)	0,236±0,007	0,299±0,014	0,259±0,007	0,282±0,003	0,256±0,001
Y(NPQ)	0,065±0,007	0,034±0,013	0,065±0,001	0,059±0,003	0,060±0,004
NPQ	0,277±0,039	0,114±0,046	0,252±0,007	0,210±0,013	0,235±0,0175
qP	0,914±0,001	0,903±0,001	0,905±0,008	0,884±0,008	0,910±0,001
qN	0,256±0,027	0,124±0,045	0,242±0,005	0,210±0,011	0,229±0,014

Продолжение таблицы 3.3

1	2	3	4	5	6
qL	0,713±0,001	0,708±0,002	0,706±0,018	0,661±0,023	0,740±0,020
ETR(II)	39,70±1,90	36,70±0,100	36,90±0,40	37,10±1,90	39,00±1,98

Адаптация фотосинтетического аппарата к освещению в качестве одного из механизмов включает нефотохимическое тушение флуоресценции (НТФ) Хл. Механизм НТФ является наиболее быстрым ответом, позволяющим минимизировать генерацию АФК при избытке световой энергии. С НТФ хлорофилла связаны четыре параметра индукции флуоресценции Хл: qN, NPQ, Y(NPQ) и Y(NO). Растения, взятые сразу после ночного темнового периода и подвергнутые ТШ в течении 3 ч, имели статистически достоверное, более чем в 2,4 раза уменьшение параметра NPQ по сравнению с контролем, что свидетельствует о низком уровне защитных механизмов ФСII в «шокированных» проростках (таблица 3.3). В тоже время, последующее после ТШ освещение КС в течение 10 и 20 мин практически не изменяло параметр NPQ по сравнению с контролем. Разницы при 10 и 20 мин облучением КС не зарегистрировано. Показано незначительное уменьшение параметра NPQ по сравнению с темновыми контрольными проростками после 20-ти минутного освещения ДКС.

Для того чтобы определить вклады в утилизацию световой энергии регулируемого НТФ хлорофилла, характеризующего адаптацию фотосинтетического аппарата к избыточному количеству энергии – Y(NPQ), и нерегулируемого НТФ хлорофилла, связанного с неадаптационной диссипацией световой энергии – Y(NO), были рассчитаны соответствующие квантовые выходы (таблица 3.3). Значение Y(NPQ) в растениях, подвергнутых ТШ, также почти в два раза ниже, чем в контрольных, а последующее освещение КС полностью «снимает» этот эффект. Установлено, что облучения КС с $\lambda 660$ нм в течении 10 мин, либо ДКС с $\lambda 730$ нм в течении 20 мин в зеленых проростках ячменя практически полностью нивелирует действие теплового шока по значительному уменьшению трех из четырех параметров НТФ хлорофилла и восстанавливает значения НТФ хлорофилла, характерные для 5-дневных контрольных проростков ячменя.

В интактных проростках ячменя, подвергнутых гипертермии, зарегистрировано снижение максимального уровня флуоресценции (Fm) ФСII на 15%, уменьшение максимального (Fv/Fm) - на 8% и эффективного (Y(ФСII)) квантовых выходов ФСII. Снижение фоновой флуоресценции (Fo) адаптированных к темноте «шокированных» листьев составило 10% относительно контроля. Одновременно на 8% снизился параметр эффективности переноса электронов (ETR(2)) по сравнению с контрольными образцами. Таким образом, стрессовое

воздействие в виде ТШ приводит к снижению эффективности работы ФСII в таких растениях. Дальнейшее освещение КС с $\lambda 660$ нм в течение 10 и 20 мин приводило к восстановлению эффективности переноса электронов в ФСII. Освещение листьев ячменя, подвергнутых стрессовой гипертермии при 40°C в течении 3 ч и дальнейшему 20-минутному освещению ДКС не изменяло ETR(II) по сравнению с контрольными проростками. По литературным данным, это свидетельствует об участии в этом процессе фитохрома-В. Таким образом, можно предположить фитохром-В-зависимую регуляция функционального состояния ФСII путем изменения параметров НТФ хлорофилла в зеленых проростках ячменя в условиях гипертермии.

Измерение поглощения P700 с помощью метода импульсно-модулируемой флуоресцентной спектроскопии несет сходную информацию о ФСI (состояние донорной и акцепторной сторон, квантовые выходы и т.д.). Данные, зарегистрированные в зеленых листьях ячменя после ночной темноты и последующей гипертермии, а также в сочетании гипертермия и последующее освещение КС и ДКС, представлены в таблице 3.4. Установлено, что значительные изменения по сравнению с темновым контролем зарегистрированы для параметра P_m , характеризующего максимальную флуоресценцию P700, и для параметров квантовых выходов нефотохимического тушения ФСI - $Y(ND)$ и $Y(NA)$, являющихся мерой диссипации энергии на донорной и акцепторной стороне ФСI соответственно. Так значение P_m ФСI в листьях ячменя, подвергнутых однократному ТШ при 40°C в течении 3 ч, достоверно и значительно уменьшено по сравнению с контролем и составило лишь 27%. Последующее десятиминутное освещение КС полностью возвращает параметр P_m к исходным значениям (таблица 3.4). Освещение ДКС в течении 20 мин, как и в варианте с КС, практически не изменяет максимальную флуоресценцию P700 по сравнению с контролем. Еще большие изменения происходят в «шокированных» проростках ячменя с параметрами квантовых выходов НТФ ФСI: $Y(ND)$ и $Y(NA)$. Значительное увеличение $Y(ND)$ (почти в 6 раз) отражает повреждения, происходящие в ФСII, что вполне согласуется с описанными выше изменениями параметров флуоресценции ФСII. Одновременное уменьшение параметра $Y(NA)$ в литературе объясняется последствием активации цикла Кальвина, что является причиной увеличения эффективного квантового выхода ФСI и, соответственно, ETR(1). В результате освещения интактных проростков ячменя КС или ДКС в выбранных режимах происходит значительное возрастание параметров квантовых выходов НТФ хлорофилла ФСI.

Спектральная характеристика использованного нами освещения (практически полный КС с $\lambda 660$ нм) такова, что наблюдаемые эффекты можно отнести за счет фитохром-В-активации. Принимая во внимание литературные источники, можно предположить, что комплексы ФСI при используемых нами пара-

метрах гипертермии также регулируются фитохром-В-зависимой системой. Таким образом, наблюдается классическая фитохром-индуцируемая реакция восстановления структурно-функционального состояния ФСІ и ФСІІ в проростках ячменя, подвергнутых гипертермии.

Таблица 3.4 – Абсолютные и относительные параметры индукции флуоресценции хлорофилла ФСІ в 5-дневных проростках ячменя, адаптированных к темноте в течение 9 ч (ночной период), а затем подвергнутых ТШ в течении 3 ч, при 40°С с последующим освещением КС и ДКС

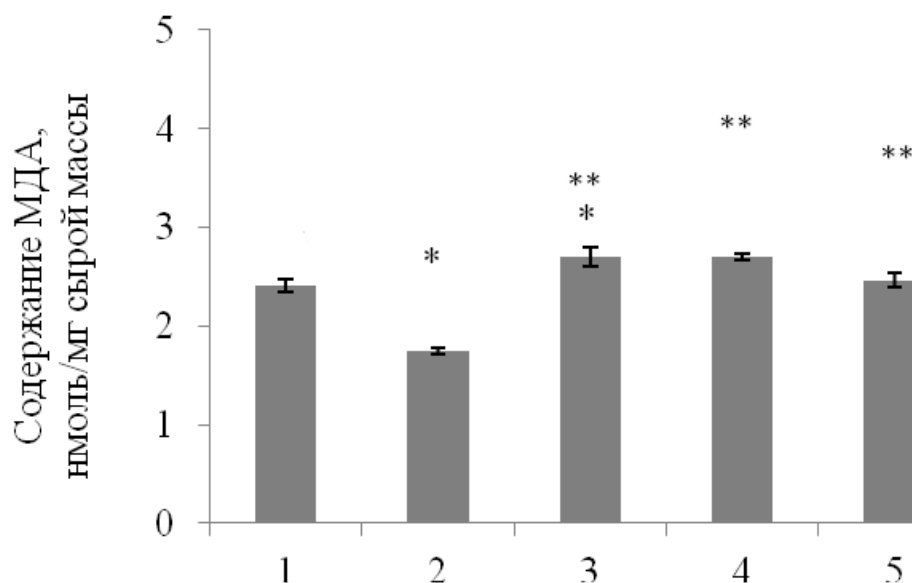
Параметр	Контроль, темнота 9 ч	ТШ 3 ч, 40°С	КС 10 мин	КС 20 мин	ДКС 20 мин
Pm	0,694±0,015	0,186±0,02	0,688±0,02	0,607±0,02	0,660±0,03
Опыт/контроль	100%	26,80%	98,8%	87,5%	95,1%
Y(1)	0,774±0,05	0,836±0,03	0,746±0,00	0,743±0,05	0,786±0,03
Опыт/контроль	100%	108,0%	96,4%	96,0%	101,5%
ETR(I)	42,6±3	45,95±1,75	41,05±0,35	40,9±3,2	43,25±2,05
Опыт/контроль	100%	107,8%	96,4%	96,0%	101,5%
Y(ND)	0,019±0,00	0,123±0,00	0,073±0,00	0,056±0,02	0,063±0,01
Опыт/контроль	100%	647,4%	384,2%	294,7%	331,5%
Y(NA)	0,21± 0,052	0,042±0,02	0,181±0,00	0,202±0,03	0,152±0,02
Опыт/контроль	100%	20,28%	87,4%	97,6%	73,4%

В ходе проведения данной работы впервые получены экспериментальные данные о функционировании фотосистем в условиях гипертермии и действия красного света, адресованного фитохрому, в зеленых проростках ячменя [12]. В частности показано, что в интактных проростках ячменя при гипертермии регистрируется снижение максимального уровня флуоресценции ФСІІ (на 15%), а эффективности переноса электронов через ФСІІ – на 70% по сравнению с контролем. Дальнейшее освещение КС с $\lambda=660$ нм приводит к восстановлению эффективности переноса электронов через ФСІІ. Три из четырех параметров НТФ хлорофилла после теплового стресса претерпевали более чем двукратное уменьшение по сравнению с контролем. Последующее освещение КС, а также облучение ДКС с $\lambda=730$ нм полностью устраняло негативное действие ТШ на параметры НТФ хлорофилла. Параметры индукции флуоресценции ФСІ показали активацию цикла Кальвина в проростках ячменя в условиях гипертермии. Последующее облучение низкоинтенсивным КС восстанавливало первоначальные параметры, а освещение ДКС не изменяло параметры НТФ хлорофилла ФСІ по сравнению с контролем. Спектральная характеристика использованного освещения такова, что наблюдаемые эффекты можно отнести за счет фитохром-В-активации. Следовательно, в изученных условиях наблюдает-

ся классическое фитохром-В-индуцируемое восстановление структурно-функционального состояния ФСІ и ФСІІ после гипертермии.

3.3. Влияние света разного спектрального состава на окислительный статус проростков ячменя в нормальных физиологических условиях и при гипертермии

Состояние про- и антиоксидантной системы проростков ячменя в нормальных физиологических условиях и после проведения ТШ при 40°C, а также последующее влияние фитохромной системы на такие растения было тестировано по количеству образовавшегося стабильного продукта перекисного окисления липидов – МДА, определенного спектрофотометрически по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой. Результаты определения содержания стабильных продуктов ПОЛ в таких листьях ячменя представлены на рисунке 3.1 [11].



1 – контроль, 2 - ТШ при 40°C 3 ч, 3 - ТШ при 40°C 3 ч + КС 10 мин + 40 мин темноты, 4 - ТШ при 40°C 3 ч + КС 10 мин + ДКС 20 мин + 40 мин темноты, 5 - ТШ при 40°C 3 ч + ДКС 20 мин + 40 мин темноты, * - достоверность по отношению к 1 варианту, $p \leq 0,05$; ** - достоверность по отношению ко 2-му варианту, $p \leq 0,05$

Рисунок 3.1 - Влияние фитохромной системы на содержание продуктов ПОЛ в 5-дневных проростках ячменя в нормальных физиологических условиях и при гипертермии

Хорошо видно, что двухчасовой тепловой стресс способствовал достоверному снижению активности ПОЛ в листьях растений (на 11% по сравнению

с контролем). Облучение низкоинтенсивным монохроматическим красным светом в течение 10 мин проростков ячменя после гипертермии привело к дальнейшему снижению изучаемого параметра (на 6% по сравнению с растениями после теплового шока и на 17% по сравнению с контрольными проростками). После 20-минутного облучения ДКС и последующего затемнения для завершения происходящих процессов зарегистрирована активность ПОЛ 25,1 нмоль МДА/мг сырой массы. Последовательное освещение «шокированных» проростков ячменя сначала красным светом в течение 10 мин, а затем дальним красным светом в течение 20 мин вызвало не только восстановление исходного уровня ПОЛ, характерного для контрольных растений, растущих в нормальных физиологических условиях, но даже и некоторое его превышение. Полученные результаты свидетельствуют об изменении липидного бислоя мембран под действием гипертермии и последующей стабилизации внутриклеточных мембран фотосинтетического аппарата в листьях ячменя в результате воздействия фитохромной системы.

Таким образом, в проведенных экспериментах отмечена фитохромная регуляция структурного состояния внутриклеточных мембран хлоропластов (через влияние на липидный бислой мембран). Использование при освещении низких интенсивностей света предполагает участие в этом процессе именно низкоэнергетической фитохром-В-контролируемой реакции.

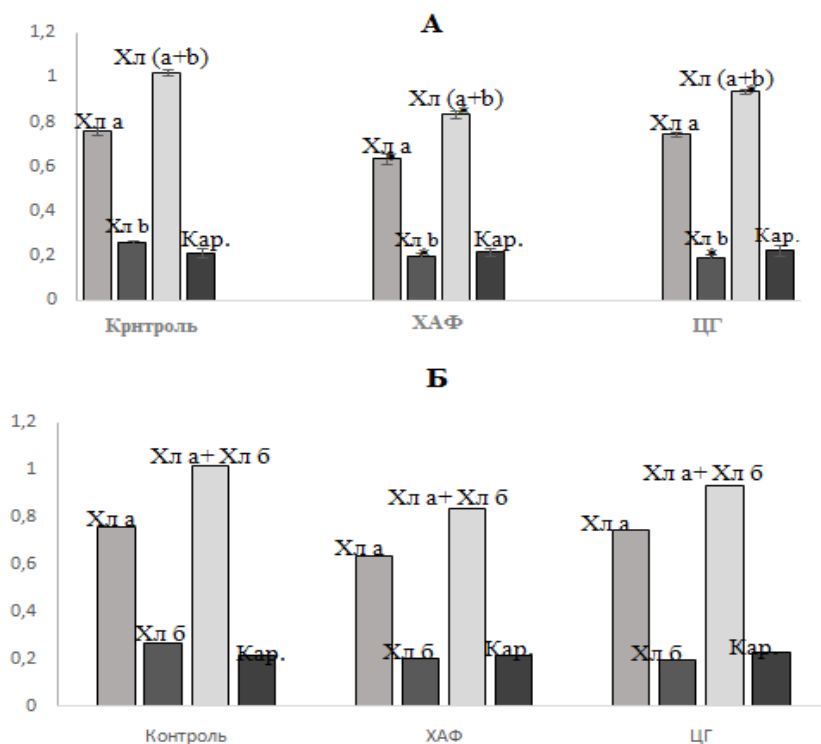
3.4. Влияние света разного спектрального состава на структурно-функциональное состояние фотосинтетических мембран при онтогенетических изменениях листьев ячменя в нормальных физиологических условиях и при гипертермии

Использование ингибиторов белкового синтеза является широко распространенным приемом изучения биогенеза хлоропластных мембран. Известно [48], что ингибиторы тормозят накопление пигментов и белка в зеленеющих листьях, образование двух фотосистем фотосинтеза, их пигмент-белковых и других компонентов фотосинтетического аппарата. Наиболее часто применяют циклогексимид (ЦГ) – специфический ингибитор подавления деятельности 80 S-рибосом и хлорамфеникол – известный как специфический эффектор 70 S-рибосом пластид и митохондрий [3, 45, 35].

Обработка обоими ингибиторами белкового синтеза зеленых 4-дневных растений на корню, за сутки до стрессового воздействия ТШ при 40°C, вызывало небольшое торможение накопления Хл: содержание суммарного Хл в варианте с ЦГ уменьшалось на 9 % по сравнению с необработанными проростками, а в варианте с ХАФ – на 12 % (рисунок 3.2, А). При этом в наибольшей степени

затрагивался синтез Хл а и Хл b, в то время как содержание каротиноидов оставалось на одном уровне во всех трех вариантах опыта. Не зарегистрировано статистически достоверного изменения количества общего белка в обоих ингибиторных вариантах опыта.

Через 48 ч пребывания на антибиотиках содержание фотосинтетических пигментов в варианте с применением в качестве ингибитора хлорамфеникола значительно уменьшилось: содержание Хл а – на 56%, Хл b – на 90% (их сумма – на 60%) и каротиноидов – на 52% по сравнению с необработанными проростками (рисунок 3.2,Б). Для варианта с ЦГ ингибирование всех вышеперечисленных пигментов колебалось от 15 до 20% по сравнению с контролем. Общее содержание белка во всех трех вариантах опыта оставалось на уровне необработанных листьев. Оба ингибитора белкового синтеза вызывали замедление роста проростков (от 20 до 40%), заметное уже при 24 ч пребывания на растворах антибиотиков.



А – 24 ч пребывания на поверхности воды (контроль) или растворах ингибиторов белкового синтеза ЦГ и ХАФ; Б – 48 ч пребывания на поверхности воды (контроль) или растворах ингибиторов белкового синтеза ЦГ и ХАФ; различия достоверны при $p \leq 0,05$

Рисунок 3.2 – Содержание фотосинтетических пигментов (хлорофиллов и каротиноидов) в 5-дневных зеленых проростках ячменя

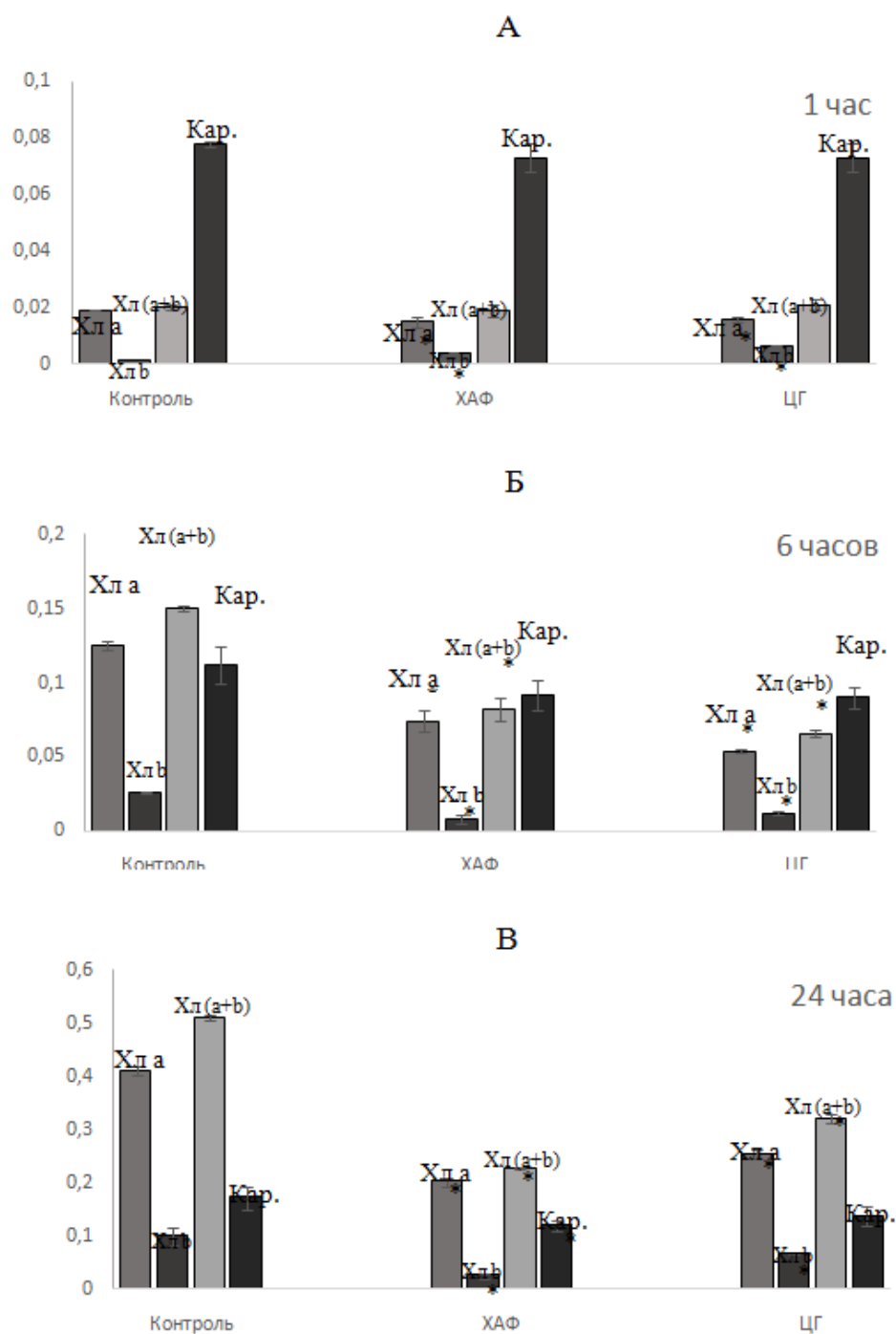
В результате выполнения экспериментов, в которых в качестве модельной системы для изучения специфического действия антибиотиков,

направленных на ингибирование синтеза белков, выбраны молодые (4-дневные) этиолированные проростки ячменя. Установлено, что уровень содержания суммарного Хл (a+b) в обработанных ХАФ проростках через 6 ч освещения снизился на 45 % по сравнению с контролем, а через 24 ч – на 55 % (рисунок 3.3, Б, В). Для растений с ингибированием на 70 S-рибосомах пластид и митохондрий общее содержание Хл было уменьшено на 56 % через 6 ч зеленения и на 37 % – через 24 ч по сравнению с исходным уровнем (рисунок 3.3, Б, В).

Ингибиторы действовали и на накопление общего белка в постэтиолированных растениях. В вариантах как с ХАФ, так и с ЦГ содержание белка, измеренное по методу Брэдфорд, после 24 ч зеленения было на 5–7 % ниже, чем в контрольных образцах. Ингибирующее действие антибиотиков также проявлялось в торможении роста проростков, что особенно четко отмечено в варианте с ЦГ.

Изучено влияние фитохрома на эффективность функционирования фотосинтетического аппарата ФСII в постэтиолированных проростках ячменя контрольного (таблица 3.5) и ингибиторного (ХАФ) вариантов (таблица 3.6), освещенных 1 ч непрерывным светом, а затем подвергнутых ТШ при 40°C в течение 2 и 3 ч. Прогревание инкубированных на воде проростков в течение 2 или 3 ч при 40°C после 1 ч зеленения отчетливо регистрирует нарушение как фотохимической активности ФСII, оцененное по потенциальному и эффективному квантовому выходам фотохимических реакций ФСII, так и функциональной активности электрон-транспортной цепи (ETR(II)) ФСII.

В наибольшей степени при этом затрагивается механизм НТФ, являющийся наиболее быстрым ответом при стрессовых воздействиях. Три из четырех основных показателей НТФ: qN, NPQ, Y(NPQ) были достоверно уменьшены при ТШ на 10-20% по сравнению с контрольными проростками, что свидетельствует о нарушении защитных механизмов ФСII в постэтиолированных растениях с еще не полностью сформированным фотосинтетическим аппаратом. Следует отметить, что эти нарушения по некоторым показателям были чуть более выражены в опытах с 3 ч гипертермией, а по ряду других – сопоставимы. В связи с этим, в дальнейших экспериментах был использован 2 ч ТШ при 40°C.



А – 24 ч пребывания на поверхности воды (контроль) или растворах ингибиторов белкового синтеза ЦГ и ХАФ и освещенных 1 ч; Б – 24 ч пребывания на поверхности воды (контроль) или растворах ЦГ и ХАФ и освещенных 6 ч; В – 24 ч пребывания на поверхности воды (контроль) или растворах ЦГ и ХАФ и освещенных 24 ч; различия достоверны при $p \leq 0,05$

Рисунок 3.3 – Содержание фотосинтетических пигментов (хлорофиллов и каротиноидов) в 5-дневных постэтиолированных проростках ячменя

Таблица 3.5 – Параметры индукции флуоресценции хлорофилла ФСII в 5-дневных постэтиолированных проростках ячменя контрольного варианта, освещенных в течении 1 ч, а затем подвергнутых ТШ в течении 2 или 3 ч при 40°C

Параметр ПАМ	Контроль, 1 ч света	Контроль, 1 ч света + ТШ 2 ч, 40°C	Контроль, 1 ч света + ТШ 3 ч, 40°C
Fv/Fm	0,499±0,014	0,389±0,029 *	0,416±0,021 *
Y(ФСII)	0,184±0,011	0,165±0,026	0,169±0,025
Y(NO)	0,508±0,011	0,583±0,020 *	0,560±0,013 *
Y(NPQ)	0,308±0,005	0,289±0,003 *	0,272±0,004 *
NPQ	0,608±0,031	0,496±0,016 *	0,486±0,012 *
qP	0,436±0,021	0,367±0,008 *	0,443±0,034
qN	0,508±0,014	0,475±0,014	0,464±0,001 *
ETR(II)	10,10±0,24	9,25±0,14*	7,05±0,559 *
Примечание – * различия достоверны при $p \leq 0,05$			

Как было показано выше, при 1 ч освещения содержание основных фотосинтетических пигментов и каротиноидов в постэтиолированных проростках под действием ингибиторов белкового синтеза изменяется незначительно (рисунок 3.5). Однако сравнение параметров прижизненной регистрации индукции флуоресценции в постэтиолированных растениях после 1 ч освещения, растущих на воде (контроль) или на растворе ХАФ, показало значительное, более чем в два раза снижение всех основных параметров в ингибиторном варианте (таблица 3.6).

Таблица 3.6 – Параметры индукции флуоресценции хлорофилла ФСII в 5-дневных постэтиолированных проростках ячменя контрольного (вода) и ингибиторного (ХАФ) вариантов, освещенных в течении 1 ч, а затем подвергнутых ТШ в течении 2 ч при 40°C

Параметр	Контроль, 1 ч света	Контроль, 1 ч света + ТШ 2 ч, 40°C	ХАФ 1 ч света	ХАФ 1 ч света + ТШ 2 ч, 40°C
1	2	3	4	5
Fv/Fm	0,499±0,014	0,389±0,029 *	0,174±0,078*	0,089±0,011*

Продолжение таблицы 3.6

1	2	3	4	5
Y(ФСII)	0,184±0,011	0,165±0,026	0,046±0,007*	0,015±0,005*
Y(NO)	0,508±0,011	0,583±0,020*	0,785±0,082*	0,842±0,032*
Y(NPQ)	0,308±0,005	0,289±0,003*	0,170±0,089*	0,144±0,036*
NPQ	0,608±0,031	0,496±0,016*	0,232±0,013*	0,172±0,049*
qP	0,436±0,021	0,367±0,008 *	0,383±0,021*	0,187±0,075*
qN	0,508±0,014	0,475±0,014	0,290±0,013*	0,258±0,058*
ETR(II)	10,10±0,24	9,25±0,14*	2,50±0,40*	0,85±0,25*
Примечание – * различия достоверны при $p \leq 0,05$				

Специфическое ингибирование 70 S-рибосом пластид и митохондрий привело к уменьшению максимального квантового выхода ФСII более чем на 60%, эффективного квантового выхода ФСII – на 75%, эффективности электрон-транспортной цепи ФСII (ETR(II)) – на 75% по сравнению с контрольными постэтиолированными проростками. Одновременно все показатели НТФ хлорофилла тоже снижены более чем в два раза. В то же время показатель квантового выхода нерегулируемого рассеивания энергии ФСII – Y(NO) – увеличивается на 15 % при ТШ, на 54% - в растениях ингибиторного варианта, и на 66 % – в варианте ХАФ+ТШ. Повышение этого показателя интерпретируется как блокирование реакционных центров ФСII, что приводит к нарушению транстилакоидного протонного градиента, и как следствие, гибели растения. Дальнейший двухчасовой ТШ при 40°C для растений, в течении суток растущих на ингибиторе белкового синтеза ХАФ, еще больше усугубил этот процесс: показатель Fv/Fm в таких растениях уменьшен на 80%, Y(ФСII) и ETR(II) – более чем на 90%, Y(NPQ) – на 55%, qN – на 50%, NPQ – на 70% по сравнению с водным контролем. Для постэтиолированных проростков ячменя, освещенных 24 ч белым светом, зарегистрирована аналогичная тенденция для параметров ФСII.

Особенно интересными представляются данные, полученные по фитохромному регулированию пигмент-белковых комплексов ФСII в постэтиолированных проростках ячменя, освещенных 24 ч белым светом и подвергнутых ТШ в течении 2 ч при 40°C. Эти растения затем последовательно освещали КС в течении 10 мин, либо КС 10 мин в сочетании с ДКС 20 мин, либо только ДКС в течении 20 мин и оставляли на 1 ч в темноте для завершения репарационных процессов (таблица 3.7).

Таблица 3.7 – Параметры индукции флуоресценции хлорофилла ФСII в 5-дневных постэтиолированных проростках ячменя, выдержанных 24 ч на воде (контроль) и ХАФ, а затем освещенных в течении 24 ч и подвергнутых ТШ в течении 2 ч при 40°C

Параметр	Контроль, 24 ч света	Контроль, 24 ч света + ТШ 2 ч, 40°C	ХАФ 24 ч света	ХАФ 24 ч света+ ТШ 2 ч, 40°C
Fv/Fm	0,631±0,010	0,673±0,015	0	0,077±0,011
Y(ФСII)	0,540±0,011	0,464±0,035	0	0,02±0,009
Y(NO)	0,314±0,009	0,379±0,019	0,985	0,873±0,015
Y(NPQ)	0,146±0,008	0,137±0,016	0,015	0,108±0,011
NPQ	0,464±0,010	0,413±0,022	0,067	0,123±0,00
qP	0,788±0,013	0,726±0,025	1,0	0,261±0,009
qN	0,385±0,012	0,367±0,018	1,0	0,200±0,006
qL	0,540±0,013	0,490±0,013	0,986	0,247±0,016
ETR(II)	29,70±2,01	25,55±1,95	0	1,1±01,5

Такая же схема опыта применялась и для постэтиолированных проростков, растущих на ингибиторах белкового синтеза. Хорошо видно, что для растений после гипертермии зарегистрировано уменьшение большинства параметров индукции флуоресценции ФСII. Освещение низкоэнергетическим КС с $\lambda=660$ нм в течение 10 мин приводит к восстановлению эффективного квантового выхода (Y(ФСII)), параметров НТФ: NPQ, qN, и эффективности переноса электронов ФСII (ETR(2)). Еще более существенное восстановление параметров индукции флуоресценции до исходного уровня контрольных растений происходит при освещении КС 10 мин + ДКС 20 мин. То есть наблюдается «классическая» фитохромная регуляция восстановления активности функционирования ФСII после гипертермии с участием ФХ-В. Установлено, что облучение ДКС с $\lambda=730$ нм в течение 20 мин практически полностью устраняет пагубное влияние ТШ на постэтиолированные проростки. По литературным данным, это может свидетельствовать об участии в процессе фитохрома-А. Таким образом, в экспериментах на постэтиолированных растениях подтверждена регуляция НТФ ФСII с участием низкоэнергетической фитохром-В-контролируемой реакции и фитохром-А.

Таблица 3.8 – Параметры индукции флуоресценции хлорофилла ФСII в 4-дневных постэтиолированных проростках ячменя контрольного варианта, освещенных в течении 1 ч, подвергнутых ТШ в течении 2 ч при 40°C с последующим освещением КС и ДКС

Параметр РАМ	Контроль, 1 ч света	Контроль, 1 ч света + ТШ 2 ч, 40°C	Контроль, 1 ч света + ТШ 2 ч, 40°C+ КС10'	Контроль, 1 ч света + ТШ 2 ч, 40°C+ КС10'+ДКС20'	Контроль, 1 ч света + ТШ 2 ч, 40°C+ ДКС20'
Y(ФСII)	0,496	0,414	0,436	0,486	0,451
Y(NO)	0,342	0,414	0,428	0,392	0,373
Y(NPQ)	0,162	0,152	0,152	0,180	0,182
NPQ	0,475	0,370	0,420	0,463	0,495
qP	0,743	0,698	0,712	0,750	0,705
qN	0,395	0,343	0,347	0,402	0,411
ETR(II)	27,3	22,8	24,0	26,0	24,8

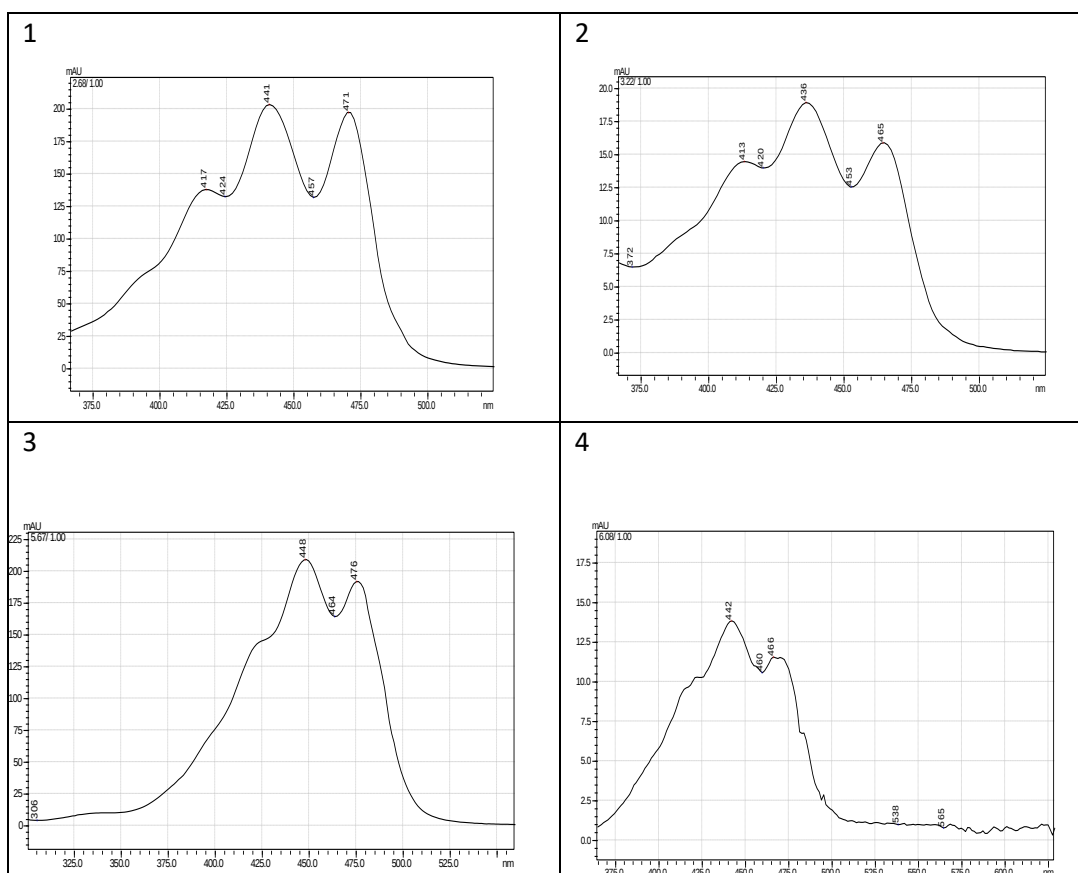
В наших экспериментах с антибиотиками были параллельно использованы два модифицирующие фотосинтетические мембраны компонента: гипертермия или ТШ при 40°C и изменение стехиометрии структурных компонентов внутриклеточных пластид путем ингибирования синтеза белка на 70 S-рибосомах пластид и митохондрий и 80 S-рибосомах хлоропластов. Сам по себе ТШ при 40°C уже является сильным стрессовым фактором для растений, так как ФСII и кислород-выделяющий комплекс рассматриваются как наиболее уязвимые компоненты фотосинтетического аппарата. Результаты, приведенные в таблице 3.7, хорошо демонстрируют, что как контроле, так и после ТШ в необработанных проростках регистрируются все основные параметры индукции флуоресценции ФСII. При этом, вариант с действием гипертермии показал уменьшение параметров НТФ (qN, NPQ, Y(NPQ) и, соответственно, увеличение Y(NO). Применение ингибиторов белкового синтеза ХАФ и ЦГ (инкубирование этиолированных проростков на корню в темноте за сутки до освещения) как само по себе, так и в совокупности с тепловым шоком привело к тому, что в постэтиолированных проростках ячменя, освещенных 24 ч (таблица 3.6), прижизненные параметры индукции флуоресценции в ингибиторном варианте практически не регистрировались.

3.5. Исследование влияния системы фитохрома на функционирование ксантофиллового цикла в зеленых растениях ячменя при нормальных физиологических условиях и гипертермии

В обзоре [34] показано, что даже кратковременное действие неблагоприятной температуры может приводить к существенному снижению содержания Хл. Часто изменению температурного режима сопутствуют и другие стрессовые факторы, например, повышение или снижение уровня освещенности. Известно, что даже относительно слабый свет может подавлять активность фотосинтетического аппарата в условиях холодового или теплового стресса. Степень фотоингибирования определяется преимущественно инактивацией реакционного центра ФСII, но причины и механизмы, вызывающие эти изменения, могут существенно различаться [34].

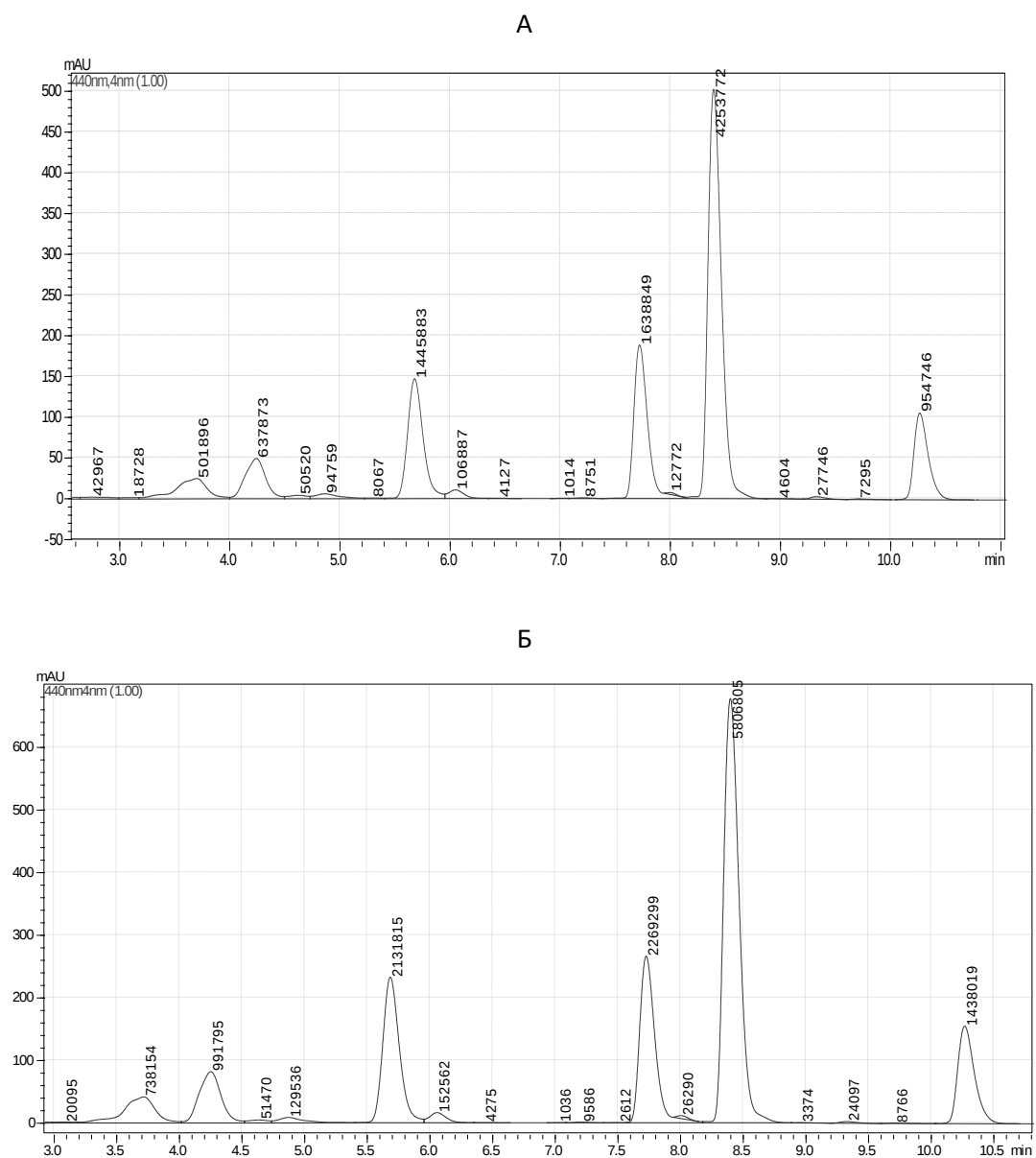
Ксантофилловый (он же виолоксантиновый) цикл является одним из наиболее важных фотозащитных механизмов, работающих у высших растений [9]. При высокой интенсивности света результатом активной работы электрон-транспортной цепи фотосинтеза является закисление люмена тилакоидов и активация фермента виолоксантин дезпоксидазы. Происходит восстановление эпоксидных групп виолоксантина через образование антероксантина до зеаксантина, который и выполняет фотопротекторную функцию [9, 32]. Изучить пигментный состав проростков ячменя в условиях гипертермии, а также влияние на него света, адресованного фитохрому можно с помощью ВЭЖХ.

На первом этапе работы необходимо было изучить пигментный аппарат зеленых 5-дневных листьев ячменя, растущих в нормальных физиологических условиях, после ночного темного периода (9 ч) и освещения их по ранее принятой схеме КС или ДКС. Хроматография позволила выявить в экстрактах зеленых листьев из опытных и контрольных образцов 8 полос, принадлежащих фотосинтетическим пигментам, с практически одинаковым временем выхода каждого из них во всех вариантах опыта. Отмечены лишь количественные различия, характеризующиеся разной высотой пиков и разными площадями, занимаемыми каждой из соответствующих полос во всех вариантах. В связи с отсутствием стандартов ксантофилловых пигментов их идентифицировали по времени выхода пиков и спектрам поглощения этих пиков, а затем сравнивали с литературными данными с учетом используемого растворителя. В экстрактах обнаружены ксантофиллы: неоксантин, виолоксантин, антероксантин, лютеин, зеаксантин (рисунок 3.4), а также хлорофиллы а, в и каротиноид – β -каротин (рисунки 3.5 и 3.6). В большой доле вероятности пик за лютеином с временем выхода 6,08 мин принадлежит одному из изомеров пигмента зеаксантина. Более точный ответ можно получить лишь при использовании стандартных препаратов ксантофиллов.



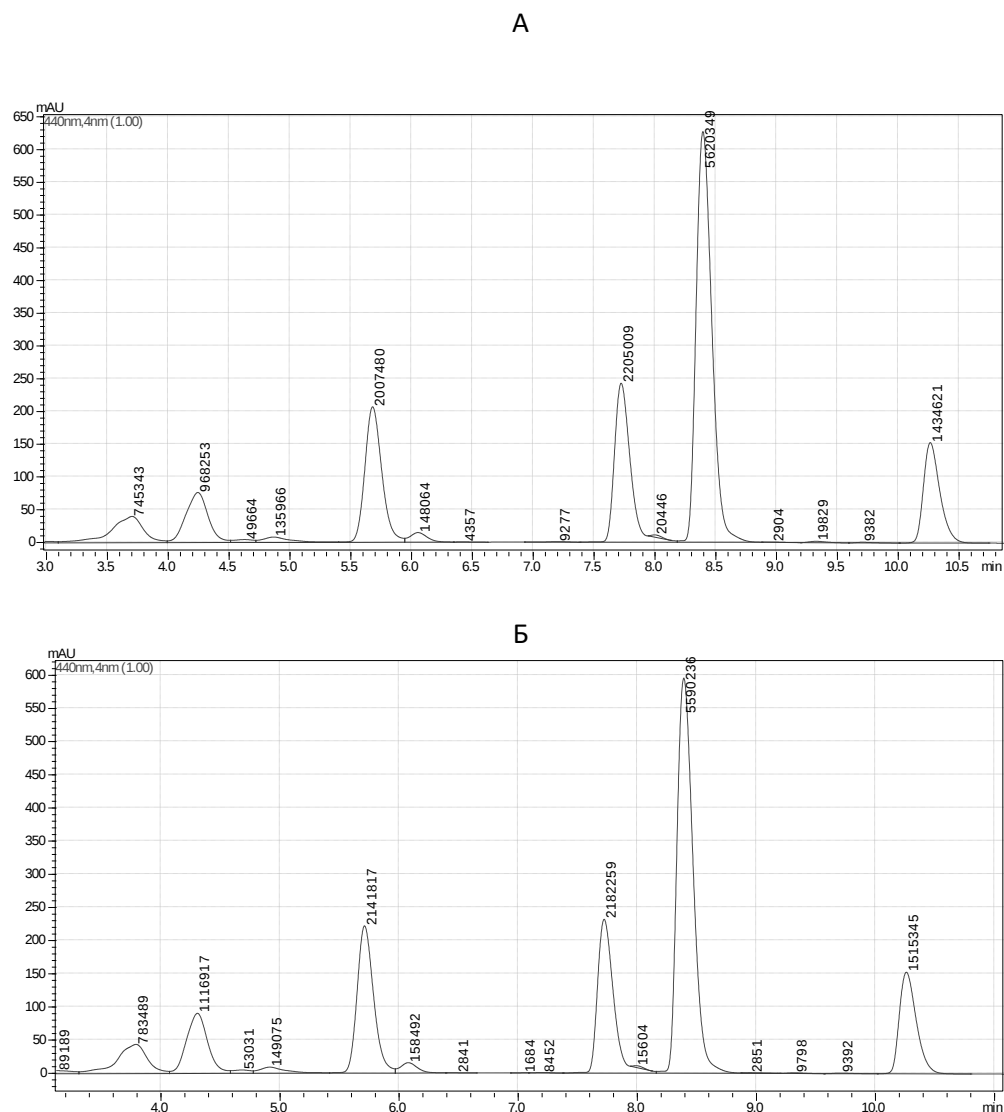
1 – виолоксантин, 2— антероксантин, 3 – лютеин, 4 – изомер зеаксантина

Рисунок 3.4 – Спектры поглощения пиков ксантофилловых пигментов в 5-дневных зеленых проростках ячменя, растущих в нормальных физиологических условиях



А – контроль, Б – освещение 10 мин КС и затемнение на 30 мин

Рисунок 3.5 – Хроматографическое разделение хлорофиллов, ксантофиллов и каротиноидов в 5-дневных зеленых проростках ячменя



А – освещение 10 мин КС+20 мин ДКС и затемнение на 30 мин,

Б – освещение 20 мин ДКС и затемнение на 40 мин

Рисунок 3.6 – Хроматографическое разделение фотосинтетических пигментов (хлорофиллов, ксантофиллов и каротиноидов) в 5-дневных зеленых проростках ячменя

Количественное сравнение разных вариантов обработок КС и ДКС в проростках ячменя, растущих в нормальных контролируемых условиях, приведено в таблице 3.9. Показано, что суммарное содержание всех ксантофилловых пигментов значительно повышено по сравнению с контролем: при освещении КС в течение 10 мин на 48,8%, совместном освещении КС 10 мин +ДКС 20 мин – на 42,8%. Освещение только ДКС 20 мин с последующим затемнением на 40 мин увеличила содержание желтых пигментов ксантофиллов на 54,6%. При этом

отмечено, что содержание антероксантина и лютеина увеличивается в меньшей степени, чем неоксантина, виолоксантина и зеаксантина.

Таблица 3.9 – Содержание ксантофилловых пигментов в 5-дневных проростках ячменя, адаптированных к темноте в течение 9 ч (ночной период), а затем освещенных КС и ДКС с последующим затемнением

Варианты обработок	Ксантофилловые пигменты, мкг/г сырого веса				
	Неоксантин	Виолоксантин	Антероксантин	Лютеин	Изомер Зеаксантин
1. Контроль	32,6±2	28,1±3	8,1±1	65,1±8	8,7±2
2. +10 мин КС+ 40 мин темноты	48,0±5	43,6±3	10,1±2	95,9±10	12,4±
3. +10 мин КС+20 мин ДКС + 40 мин темноты	46,4±4	40,6±3	8,4±4	90,3±8	10,0±3
4. +20 мин ДКС+ 40 мин темноты	50,9±3	49,1±2	11,3±2	96,4±9	12,8±4
Примечание – Представлены результаты типичного опыта					

Другими словами, в нормальных физиологических условиях освещения светом, адресованным фитохрому, вызывает активацию заключительных стадий ксантофиллового цикла. Под действием КС и ДКС активировался не только виолоксантиновый цикл, но и значительно увеличивалось содержание зеленых пигментов – Хл а и Хл в, а также β-каротина (таблица 3.10). Таким образом, состояние пигментного фонда зеленых проростков ячменя, растущих в нормальных физиологических условиях, было модифицировано путем освещения КС и ДКС.

Таблица 3.10 – Содержание хлорофилловых пигментов и каротиноидов в 5-дневных проростках ячменя, адаптированных к темноте в течение 9 ч (ночной период), а затем освещенных КС и ДКС с последующим затемнением

Варианты обработок	Пигменты, мкг/г сырого веса		
	Хл в	Хл а	β-каротин
1	2	3	4
1. Контроль	280,1±12	804,0±10	84,0±8
2. +10 мин КС+ 40 мин темноты	413,0±20	1097,5±17	126,5±11
3. +10 мин КС+20 мин ДКС + 30 мин темноты	401,3±17	1062,2±20	126,2±13

Продолжение таблицы 3.10

1	2	3	4
4. +20 мин ДКС+ 40 мин темноты	397,2±15	1056,6±18	133,4±15
Примечание – Представлены результаты типичного опыта			

Экспериментально показано увеличение как пигментов ксантофиллового цикла, так и хлорофиллов под действием фитохрома. Стимулирующее действие было зарегистрировано как при активации с помощью низкоэнергетического красного света с $\lambda 660$ нм, так и при освещении ДКС. Свет 730 нм лишь частично уменьшает наблюдаемый физиологический эффект. Это может свидетельствовать об участии в этом процессе одновременно низкоэнергетической фитохром-В-контролируемой реакции и фитохром-А.

Таким образом, проведенные эксперименты с использованием ВЭЖХ хроматографии экстрактов пигментов из зеленых листьев ячменя позволили установить различия в количественном, но не качественном составе фотосинтетических пигментов при действии света, адресованного фитохрому, в проростках ячменя, подвергнутых гипертермии. Экспериментально установлено, что после гипертермии КС индуцирует переход неактивной формы фитохрома в физиологически активную форму, которая защищает фотосинтетические пигменты (хлорофилл и каротиноиды) от деградации в условиях гипертермии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При выращивании растений в условиях теплиц применяются различные источники искусственного света для дополнительного освещения. В настоящее время в теплицах используются светодиодные осветители, которые стимулируют рост растений и повышают их устойчивость к патогенам. Часто используются светодиодные осветители, излучающие свет в красной области спектра, в которой поглощают свет такие фоторецепторы, как фитохром. Температура выращивания разных культур в теплицах также повышена. Сочетанному действию двух факторов: повышенной температуры и освещения красным светом разной спектральной направленности и посвящена данная работа. Изложенные в настоящей работе экспериментальные данные показывают, что в проростках ячменя, предварительно подвергнутых гипертермии, а затем освещенных светом, адресованным разным спектральным формам фитохрома, происходят характерные и существенные изменения в работе фотосинтетического аппарата и защитной системы растений.

В растениях существует защитная система, задачей которой является противодействие различным неблагоприятным факторам внешней среды. Обычно она должна на клеточном и молекулярно-мембранном уровнях противостоять окислительному стрессу, вызванному накоплением АФК. В норме содержание АФК в растительной клетке поддерживается на стабильно низком уровне, что обеспечивается работой антиоксидантной системы растений, в частности функционированием супероксиддисмутазы, аскорбат-глутатионового цикла, каталазы и другими ферментами, а также стрессовых белков. В частности, описано, что при освещении светом красных светодиодов в растениях огурца происходит активация цикла детоксикации АФК: увеличение активности хлоропластной супероксидредуктазы, а именно ее цитозольной изоформы, а также интенсификация работы аскорбат-глутатионового цикла [8]. При использовании красных светодиодов выявлена тенденция к активации компонентов антипатогенной защиты, что подтверждается увеличением активности фенольной пероксидазы и уровней экспрессии защитных PR-генов [8]. Приведенные в нашей работе данные позволяют расширить и дополнить имеющиеся сведения о механизмах действия красного света, восстановлении структурно-функционального состояния и защитных механизмов действия света, адресованного фитохрому, после повреждения клеточных структур тепловым стрессом (на примере зеленых и постэтиолированных проростков ячменя).

Адаптация фотосинтетического аппарата к изменяющимся условиям окружающей среды в качестве одного из механизмов включает НТФ. Механизм НТФ является наиболее быстрым ответом, позволяющим минимизировать ге-

нерацию активных форм кислорода при избытке световой энергии. С НТФ связаны четыре параметра индукции флуоресценции Хл: qN , NPQ , $Y(NPQ)$ и $Y(NO)$. Три из четырех параметров НТФ в проростках ячменя, подвергнутых ТШ в течение 3 ч при 40°C, а затем освещенных КС и ДКС разной продолжительности, показали одну и ту же тенденцию: растения, взятые сразу после ночного периода и подвергнутые ТШ в течение 3 ч, имели статистически достоверное, более чем в 2,4 раза уменьшение параметра NPQ по сравнению с контролем, что свидетельствует о низком уровне защитных механизмов ФСII в «шокированных» проростках. В то же время, последующее после ТШ освещение КС в течение 10 и 20 мин восстанавливало значения NPQ до исходного уровня контрольных растений. Значение $Y(NPQ)$ в растениях, подвергнутых ТШ, также почти в два раза ниже, чем в контрольных проростках, а последующее освещение КС возвращает значения $Y(NPQ)$ к уровню контроля. Установлено, что облучения ДКС с $\lambda=730$ нм в течение 20 мин в зеленых проростках ячменя практически полностью нивелирует действие ТШ по значительному уменьшению трех из четырех параметров НТФ и восстанавливает значения НФТ, характерные для 5-дневных контрольных проростков ячменя. Регуляция НТФ ФСII с помощью низкоэнергетического красного света с $\lambda=660$ нм может свидетельствовать об участии в этом процессе низкоэнергетической ФХ-контролируемой реакции [16, 35]. Стандартным тестом на регуляцию какого-либо процесса фитохромом является обратимость этого процесса дальним КС, что мы и наблюдали в наших экспериментах. Облучение листьев после темновой адаптации только дальним КС никак не изменяло параметры НТФ: qN , NPQ , $Y(NPQ)$ и $Y(NO)$ сразу после освещения, так и через 2-часовой темновой период, что может свидетельствовать об участии в этом процессе именно ФХ-В.

Экспериментально показано, что в условиях ТШ (нагревание зеленых листьев ячменя при 40°C в течение 2 или 3ч) подавляется электронный транспорт как на донорной, так и на акцепторной стороне ФСII. В таких условиях ослабляется интенсивность фотохимических реакций в ФСII и параметров флуоресценции ФСI. Освещение светом, адресованным разным спектральным формам фитохрома, оказывает регулирующее действие в восстановлении нарушенного при ТШ НТФ хлорофилла ФСII и параметров флуоресценции ФСI. Такое влияние фитохрома на поврежденные тепловым шоком растения, по-видимому, вызывает адаптацию фотосинтетического аппарата, позволяет ослабить накопление АФК в хлоропластах.

Использование в качестве модельной системы постэтиолированных проростков ячменя, зеленеющих 1 и 24 ч после выращивания в темноте, также подтвердило фитохромную регуляцию параметров индукции флуоресценции ФСII после стрессового воздействия. Установлено, что ингибирование синтеза белка

на 70 S рибосомах хлоропластов (митохондрий) и 80 S рибосомах хлоропластов влияет на структурно-функциональное состояние ФСII, проявляющееся в значительном снижении всех основных параметров индукции флуоресценции ФСII, вплоть до полного прекращения ее функционирования. Если деятельность ФСII не модифицирована значительным образом, а лишь частично повреждена тепловым шоком, возможны репарационные процессы через фитохром-В-зависимую регуляцию функционального состояния ФСII путем изменения параметров НТФ хлорофилла, а также эффективности переноса электронов в ФСII в молодых постэтиолированных проростках ячменя.

Хроматографическое разделение фотосинтетических пигментов с помощью ВЭЖХ позволило установить различия в количественном соотношении разных пигментов при модификации фитохрома в интактных проростках ячменя, растущих в нормальных физиологических условиях. Отмечено, что содержание антероксантина и лютеина под действием КС и ДКС увеличивается в меньшей степени, чем неоксантина, виолоксантина и зеаксантина. Установлено, что в нормальных условиях выращивания интактных проростков ячменя освещение КС и ДКС вызывает активацию заключительных стадий защитного ксантофиллового цикла.

Обнаружено снижение уровня ПОЛ в проростках ячменя после теплового стресса (42°C 2 ч). Последующее освещение низкоэнергетическим красным светом с $\lambda 660$ нм вызывает увеличение уровней ПОЛ. Последовательное освещение КС, а затем ДКС приводит к полному восстановлению исходных параметров ПОЛ, или, другими словами, к «классическому» фитохромному эффекту. Предполагается, что наблюдаемые эффекты связаны с участием именно ФХ-В. В опытах экспериментально показано регулирующее действие КС в восстановлении нарушенного при ТШ липидного бислоя клеточных мембран. Таким образом, в зеленых и постэтиолированных растениях ячменя показано классическое фитохром-В-индуцируемое восстановление структурно-функционального состояния ФСI и ФСII после теплового шока, что может лечь в основу повышения стрессоустойчивости культурных растений с использованием источников света разного спектрального состава в условиях защищенного грунта.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Абрамчик, Л. М. Превращение ксантофилловых пигментов при тепловом стрессе в зеленых проростках тритикале на свету низкой интенсивности / Л. М. Абрамчик, Н. Л. Пшибытко, Г. Е. Савченко / Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Междунар. науч. конф.; Десятый съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, 19–21 июня 2012 г. – Минск, 2012. – С. 11-13.
2. Активность антиокислительной системы и интенсивность перекисного окисления липидов в растениях пшеницы в связи с сортовой устойчивостью к переувлажнению почвы / Ю.Е. Калашников, Т.И. Балахнина, Р.П. Бенничели и др. // Физиол. раст. – 1999. – Т. 46. – №2. – С. 268-275.
3. Ашмарин И.П. Ингибиторы синтеза белка / Ашмарин И.П., Ключарев Л.А. // Ленинград: Медицина– 1975 – 208 с.
4. Букин, В.И. Фитохромы - регуляторы физиологических процессов и продуктивности растений: Лекция / В.И. Букин – Саратов: СаратовСХИ, 1980. – 23 с.
5. Влияние условий хронической и острой гипертермии и низкоинтенсивного переменного магнитного поля на функциональное состояние фотосинтетического аппарата растений *Pisum Sativum* L / Я.В. Середнева [и др.] // Вес. Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского – 2014. – № 1-2. – С. 224-228.
6. Волотовский, И.Д. Фитохром – регуляторный фоторецептор растений / И.Д. Волотовский. – Мн.: Навука і тэхніка, 1992. – 186 с.
7. Воскресенская, Н.П. Принципы фоторегулирования метаболизма растений и регуляторное действие красного и синего света на фотосинтез / Н.П. Воскресенская // Фоторегуляция метаболизма и морфогенеза растений. – М.: Наука, 1975. – С. 16-36.
8. Вязов, Е.В. Влияние спектрального состава светодиодного излучения на активность антиоксидантных ферментов и накопление защитных белков в растениях огурца / Е.В. Вязов, Н.В.Шалыго // Доклады Национальной академии наук Беларуси –2015 – Т.59. – С. 87-92.
9. Гольцев, В.Н. Использование переменной флуоресценции хлорофилла для оценки физиологического состояния фотосинтетического аппарата растений / Каладжи Х.М., Паунов М., Баба В., Хорачек Т., Мойски Я., Коцел Х., Аллахвердиев С.И. // Физиология растений. –2016. – Т. 63 – С. 881-907.
10. Доманская И.Н. Анализ содержания фотосинтетических пигментов в проростках ячменя при сочетанном действии гипертермии и света, адресованного фитохрому / И.Н. Доманская, Л.Ф. Кабашникова, И.А. Цеханович // Акту-

альні проблеми розвитку природничих та гуманітарних наук: зб. матер. Міжнар. наук. практ. конф.: ред. М.О. Зінченко, Л. Л. Макарук. – Луцьк, 2019. – С. 187-189.

11. Доманская И.Н. Влияние системы фитохрома на окислительный статус проростков ячменя при гипертермии / И.Н. Доманская, Л.В. Пашкевич, Л.Ф. Кабашникова, И.А. Цеханович // Республ. научно-практ. конференции БГПУ им. М.Танка. – Минск, 2019.

12. Доманская, И.Н. Функционирование фотосистем в условиях гипертермии и действия красного света, адресованного фитохрому, в зеленых проростках ячменя / И.Н. Доманская, И.А. Цеханович // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: тез. докл. междунар. науч. конф., 14 съезда БООФиБ; редкол.: И. Д. Волотовский (отв. ред.) [и др.]. – Минск, 2020. – С. 17.

13. Кабашникова, Л.Ф. Методы оценки физиологического состояния растений в условиях засухи / Л.Ф. Кабашникова, Н.Л. Пшибытко, Л.М.Абрамчик. – Минск: НАН Беларуси, 2007. – 42 с.

14. Кабашникова, Л.Ф. Фотосинтетический аппарат и потенциал продуктивности хлебных злаков / Л.Ф. Кабашникова. – Минск: Беларус. навука, 2011. – 327 с.

15. Кочетова, Г.В.Участие фитохромов А и В в регуляции устьичных движений у *pisum sativum* L.: автореф. дис....канд. биол. наук: 03.00.12 / Г.В. Кочетова; Московском Государственном Университете имени М.В. Ломоносова – Москва, 2008. – 24 с.

16. Ладыгин, В. Г. Пути биосинтеза, локализация, метаболизм и функции каротиноидов в хлоропластах различных видов водорослей / Ин-т фундамент. Проблем биологии. – Пущино, 2015. – 87 с.

17. Рабаданова, К.К. Взаимосвязь фитохромной регуляции цветения и стабильности фотосинтетического аппарата у *arabidopsis thaliana* и *hordeum vulgare* / К.К. Рабаданова [и др.] // Ботаника в современном мире. Труды XIV Съезда Русского ботанического общества и конференции «Ботаника в современном мире» (г. Махачкала, 18–23 июня 2018 г.). Т. 3: Споровые растения. Микология. Структурная ботаника. Физиология и биохимия растений. Эмбриология растений. – Махачкала, 2018. – С. 324–325.

18. Реакция генотипов смородины красной на стрессовые факторы вегетационного периода / О.Д. Голяева, О. В. Панфилова // Плодоводство и ягодоводство России. – Том XXXII. –Часть 1. –М., 2012. –С.82-87.

19. Синещеков, В.А. Фитохром А: полиморфизм и функциональность./ Синещеков, В.А. // Москва: Научный мир, 2013. 162 с.

20. Стржалка, К. Каротиноиды растений и стрессовое воздействие окружающей среды: роль модуляции физических свойств мембран каротиноидами /

Стржалка К., Костецка-Гугала А., Латовски Д. // Физиология растений – 2003 – Т.50. – С. 188-193.

21. Термочувствительность липоксигеназы и пигментов фотосинтеза озимой пшеницы / И.В. Косаковская [и др.] // *Biotechnologia Acta*. - 2014. - Т. 7, № 5. - С. 101-107.

22. Фенольные соединения: функциональная роль в растениях / редкол.: Н.В. Загоскина, Н.А. Тюкавкина, П.В. Лапшин // Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты: сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума, Москва, 14-19 мая 2018 г. – Москва, 2018. – С. 150 – 153.

23. Шлык, А. А. Влияние ингибирования белкового синтеза циклогексимидом на фракционирование структурных компонентов хлоропластов / Шлык А.А., Парамонова Т.К. // Докл. АН СССР– 1975 – Т. 225. – С.1221-1224.

24. Шлык А.А. Определение хлорофилла и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев / А.А. Шлык // Биохимические методы в физиологии растений. – М.: Наука, 1971. – С. 154-170.

25. Шматько, И.Г. Устойчивость растений к водному и температурному стрессам / И.Г. Шматько, И.А. Григорюк, О.Е. Шведова; Под ред. И.Г. Шматько. – Киев: Наук. Думка, 1989. – 224 с.

26. Asada, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions / K. Asada // *Plant Physiology*. – 2006. – V. 141. – P. 391–396.

27. Bjorkman, O. Viewpoints on Photosynthetic Response and Adaptation to Environmental Stress / O. Bjorkman // *Photosynthesis*, New York: Alan R. Liss, – 1989. – P. 45–58.

28. Changes in leaf protein and pigment contents and photosynthetic activities during senescence of detached maize leaves - influence of different ultraviolet radiations / B. Biswal, P.N. Joshi, G. Kulandaivelu // *Photosynthetica*. – 1997. – Vol. 34 – P.37–44.

29. Franklin, K.A. Phytochrome A Function in Red Light Sensing / K.A. Franklin, T. Allen // *Plant Signaling & Behavior*. – 2007. – Vol. 50, n. 2. – P. 383 – 385.

30. Foyer, C.H. sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria / C.H. Foyer, G. Noctor // *Physiologia plantarum*. 2003. V. 119. P. 355–364.

31. Gapper, C. Dolan L. Control of plant development by reactive oxygen species / C. Gapper // *Plant Physiology*. – 2006. – Vol. 141. – P. 341–345.

32. Gilmore, J.M. Resolution of lutein and zeaxanthin using a non-encapped, lightly carbon-loaded C18 high-performance liquid chromatographic column / Gilmore J.M., Yamamoto H.Y. // *J. of Chromatography* – 1991 – Vol. 543 – P. 137-145.

33. Halliwell, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life / B. Halliwell // *Plant Physiology*. – 2006. – Vol. 141. – P.312-322.
34. Hasanuzzaman M. Alteration in chlorophylls and carotenoids in higher plants under abiotic stress condition / Nahar K., Fujita M. // *In: Golovko T.K., Gruszecki W.I., Prasad M.N.V., Strzałka K.J. (Eds.) Photosynthetic Pigments: Chemical structure, biological function and ecology*. – Komi Sci. Centre Ural Branch RAS, Syktyvkar, 2014. – P. 272–319.
35. Kirk J.T.O. The relation of chlorophyll synthesis to protein synthesis in the growing thylakoid membranes / J.T.O. Kirk // *Port. Acta Biol.* – 1976 – Vol. 14 – P. 127-152.
36. Klughammer, C. An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700+-absorbance changes at 830 nm / C. Klughammer, Schreiber U. // *Planta*. – 1994 – Vol. 192. N2. – P.261-268.
37. Kramer, D.M. New flux parameters for the determination of QA redox state and excitation fluxes / D.M. Kramer, Johnson G., Kiirats O., Edwards G.E. // *Photosynthesis Research*. – 2004 – Vol. 79 – P. 209-218.
38. Krause, G.H. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis. The basics / G.H. Krause, E. Weis // *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* – 1991 – Vol. 42. – P.313-349.
39. Kreslavski, V.D. Transduction mechanisms of photoreceptor signals in plant cells / Kreslavski V.D., Carpentier R., Klimov V.V., Allakhverdiev S.I. // *J. Photochem. Photobiol. Photochem.Rev.* – 2009 – Vol.10. – P.63-80.
40. Latowski, D. The xanthophyll cycle – molecular mechanism and physiological significance / D. Latowski, J.Grzyb, K. Strazalka // *Acta Physiologia Plantarum*. – 2004 – Vol. 26. – P. 197-212.
41. Lowry, O.H., Rosenbrough N.G., Farr A.L., Randal R.I. Protein measurement with the Folin reagent / O.H. Lowry [et al.] // *J. Biol. Chem.* 1951. – V. 193, n.2. – P.215-275.
42. Lyubimov, V.Yu. Phytochrome B-dependent regulation of re-ductive phase of photosynthetic carbon assimilation / V.Yu. Lyubimov, V.D. Kreslavsky // *J. Plant Physiol.* – 2017. – Vol. 64, n. 5. – P. 776–781.
43. Makarenko, M.S. A State of PSI and PSII Photochemistry of Sunflower Yellow-Green Plastome Mutant / Makarenko M.S., Kozel N.V., Usatov A.V. et al. // *OnLineJornal of Biological Science*. – 2016. – Vol. 16 – P. 193-198.
44. Murphy, D.J. The molecular organisation of photosynthetic membranes of higher plants / D.J. Murphy // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1986. – V. 864, n. 1. – P. 33-94.

45. Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones / Deng, Xing Wang // *Current Opinion in Plant biology*. – 2010. – Vol. 13, n. 5. – P. 571–577.
46. Preillumination of lettuce seedlings with red light enhances the resistance of photosynthetic apparatus to UV-A / V.D. Kreslavski, V.Yu. Lyubimov, G.N. Shirshikova, A.N. Shmarev, A.A. Kosobryukhov, F.J. Schmitt, T. Friedrich, S.I. Al-lakhverdiev // *Journal of Photochemistry and Photobiology*. – 2013. – Vol. 122 – P.1–6.
47. Rodrigues V.M. Effect of temperature stress on the early vegetative development of *Brassica oleracea* L. ., Soengas P., Alonso-Villaverde V., Sotelo T., Car-tea M.E., Velasco P. // *BMC Plant Biology*. – 2015. – V. 15. – P. 145–153.
48. Shulaev, V. Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. New tools for reactive oxygen species research / V. Shulaev, D.J. Oliver // *Plant Physiology*. – 2006. – V. 141. – P. 367–372.
49. The impact of the phytochromes on photosynthetic processes / Vladimir D. Kreslavski [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2018. – Vol. 1859, n. 5. – P. 400 – 408.
50. Van Breusegem, F. Reactive oxygen species in plant cell death / F. Van Breusegem, J.F. Dat // *Plant Physiology*. – 2006. – Vol. 141. – P. 384–390.