

## СЕЗОННЫЕ И ТЕРМОИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФОТОСИНТЕЗА ХВОИ СОСНЫ СИБИРСКОЙ

Первичным звеном, определяющим биологическую продуктивность лесных экосистем, является интенсивность и квантовая эффективность фотосинтеза. Температура относится к основным факторам окружающей среды, влияющим на эти параметры. У большинства растений фотосинтетические процессы активно протекают при температуре 10—35°C. Особый интерес представляют хвойные породы, которые сохраняют активность и при более низких температурах. Фотосинтез прекращается при температуре ниже точки замерзания воды в хвое, что составляет около —5°C у закаленных растений (Bauer, 1975). Имеются данные о сохранении хлоропластами способности к фотофосфорилированию и выделению кислорода при —10°C в незамерзающей среде инкубации (Сох, 1975; Hall, 1963). Зимой, при низких отрицательных температурах, хвойные древесные породы сохраняют фотосинтетический аппарат, при этом происходит перестройка энергетического обмена в хлоропластах хвои.

При температурах, близких к 0°C, и коротком световом дне происходит адаптация хвойных к низким температурам. При такой холодной закалке квантовый выход фотосинтеза не изменяется (Öquist, 1980). При дальнейшем похолодании происходит так называемый «зимний стресс», выраженный сильнее при высокой освещенности. Эта стадия характеризуется уменьшением квантовой эффективности фотосинтеза, выцветанием хлорофилла и разрушением части реакционных центров и хлорофилл-белковых комплексов (Öquist, 1980). Действие отрицательных низких температур обратимо. Весной, после установления положительных температур, происходит полное восстановление фотосинтетической активности перезимовавшей хвои.

Меньше данных имеется о тепловой устойчивости хвойных и ее взаимосвязи с холодоустойчивостью. Puckacki (1982) изучал температурную зависимость стационарного уровня миллисекундной замедленной флуоресценции у двух видов ели. Как при нагревании выше +50°C, так и при охлаждении ниже —30°C происходит резкое уменьшение стационарного уровня замедленной флуоресценции, обусловленное ингибированием транспорта электронов в хлоропластах. Было показано, что теплоустойчивость раз-

лична у этих двух видов ели, отличающихся и по холодоустойчивости, и зависит от времени года и степени закалки хвои.

Мы исследовали сезонные и термоиндуцированные изменения параметров быстрой, миллисекундной и долгоживущей (секундной) флуоресценции хвои сосны сибирской.

В качестве объекта исследования использовали хвою сосны сибирской. Регистрацию параметров флуоресценции проводили непосредственно после сбора хвои. Сезонные изменения параметров флуоресценции изучали на хвое 1-го и 2-го года, измерение термоиндуцированной флуоресценции проводили на хвое 1-го года.

Относительную скорость транспорта электронов на участке фотосистемы II определяли исходя из формы зависимости интенсивности миллисекундной замедленной флуоресценции (ЗФ) от интенсивности возбуждающего света. При активной фотосистеме II световая зависимость миллисекундной ЗФ насыщения не достигается, при ингибировании транспорта электронов на уровне пластохинона, например, диуроном, интенсивность ЗФ насыщается при низких интенсивностях возбуждающего света. Миллисекундную замедленную флуоресценцию измеряли с помощью цилиндрического фосфороскопа. Время между освещением и регистрацией свечения составляло 1,25 мс, интенсивность действующего света —  $5 \cdot 10^4$  эрг/(см<sup>2</sup> · с). Световые зависимости измеряли с помощью сеток, калиброванных по пропусканию.

Повреждающее действие высоких температур на структуру и функции хлорофилл-белковых комплексов и эффективность межкомплексной передачи энергии возбуждения оценивали путем регистрации нулевого ( $F_0$ ), максимального ( $F_m$ ) уровней и переменной флуоресценции ( $\Delta F = F_m - F_0$ ) хлорофилла «а» (Сорокина и др., 1985).  $F_0$  соответствует окисленному состоянию первичного акцептора электронов фотосистемы II  $F_m$  — восстановленному состоянию,  $\Delta F$  — характеризует эффективность использования энергии возбуждения в реакционных центрах фотосистемы II. Ингибирование реакционных центров при нагревании приводит к возрастанию  $F_0$ , отделение светособирающего хлорофилл-белкового комплекса — к термоиндуцированному снижению  $F_m$  (Schreiber, 1978). Нулевой уровень флуоресценции определяли освещая клетки слабой вспышкой (0,1 Дж, 50 мкс) через синие светофильтры СС-4 и СЗС-22 и измеряя флуоресценцию хлорофилла через красный светофильтр КС-25. Термоиндуцированные изменения быстрой флуоресценции измеряли в процессе нагревания хвои со скоростью 2°С/мин.

Для регистрации повреждения кислородвыделяющей системы хвои использовали измерение долгоживущей ЗФ со времени затухания  $>1$ с, которая обусловлена рекомбинацией электронов из акцепторной части фотосистемы II с положительными заряда-

ми, накопленными в кислородвыделяющей системе (Venediktov, 1983). Интенсивность долгоживущей ЗФ определяли при освещении хвои красным светом ( $\lambda > 650$  нм) путем измерения кинетики затухания свечения через 0,5 с после прекращения освещения.

Понижение температуры вызывает уменьшение долгоживущей ЗФ. Выдерживание хвои в течение трех часов при  $+4^\circ\text{C}$  приводит к незначительному уменьшению интенсивности долгоживущего свечения. Охлаждение при отрицательных температурах ( $-5^\circ\text{C}$ ) уменьшает интенсивность свечения в два раза. При этом изменяется форма зависимости интенсивности долгоживущей ЗФ от интенсивности возбуждающего света; для контрольной хвои полунасыщенная интенсивность возбуждающего света составляет  $200 \text{ мВт/м}^2$ , что близко к величине полунасыщенной интенсивности для высших растений, в частности для гороха (Venediktov, 1983), после охлаждения до  $+4^\circ\text{C}$  полунасыщающая интенсивность составляет  $1,5 \text{ Вт/м}^2$ , а при охлаждении до  $-5^\circ\text{C}$  световая зависимость долгоживущей ЗФ насыщения достигает  $9 \text{ Вт/м}^2$  (рис. 1).

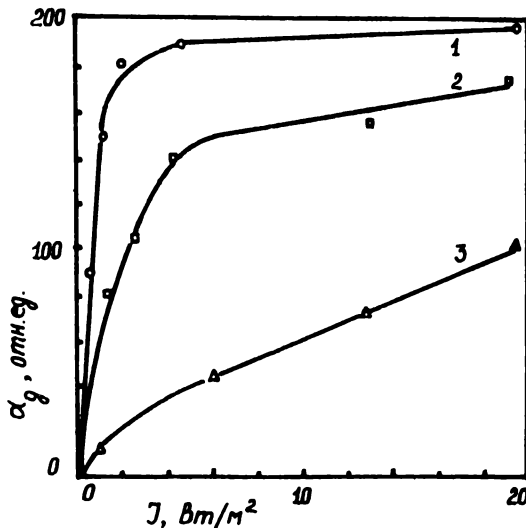


Рис. 1. Зависимость относительной интенсивности долгоживущей ЗФ ( $L_g$ ) хвои сосны сибирской от интенсивности света ( $Y$ ): 1 — непосредственно после сбора, температура воздуха  $+15^\circ\text{C}$ ; 2 — после охлаждения до  $+4^\circ\text{C}$ ; 3 — после охлаждения до  $-5^\circ\text{C}$

В зимний период 1985 г. интенсивность долгоживущего свечения уменьшилась в два раза в начале ноября и не изменялась в течение ноября—января, когда резких изменений температуры воздуха не наблюдалось (табл.). После понижения температуры воздуха до  $-30^{\circ}\text{C}$  в конце января интенсивность долгоживущей ЗФ уменьшилась в пять раз и начала возрастать только в марте, после повышения температуры воздуха до  $0^{\circ}\text{C}$ . Более устойчивой к действию низких отрицательных температур оказалась хвоя второго года: уменьшение интенсивности свечения у нее наблюдалось через две недели после того, как понизилась интенсивность долгоживущей ЗФ хвои первого года.

Сезонные изменения флуоресценции хвои  
1-го года сосны сибирской, отн. ед.

Дата измерений	Быстрая флуоресценция		Миллисекундная ЗФ	Долгоживущая флуоресценция
	$F_0$	$F_m/F_0$		
7.01	93	1,6	10	50
6.02	24	1,0	5	5
21.03	117	1,0	20	12
25.04	302	1,2	50	48
6.05	648	1,4	113	86
7.06	360	2,1	170	130
20.06	377	2,6	200	—
2.07	292	3,5	130	—

В начале октября, когда дневная температура воздуха составляла  $10-15^{\circ}\text{C}$ , наблюдаемая форма световой зависимости ЗФ была аналогична зависимости хлоропластов с активной фотосистемой II (рис. 2). После охлаждения до  $0^{\circ}\text{C}$  световая зависимость изменяется и принимает форму, характерную для хлоропластов, обработанных диуроном. По-видимому, воздействие отрицательных температур приводит к частичному ингибированию транспорта электронов на уровне первичного акцептора фотосистемы II.

При этом уменьшается и отношение  $F_m/F_0$ , характеризующее квантовую эффективность фотосинтеза: для контрольной хвои это отношение составляет 2,9, после охлаждения до  $-5^{\circ}\text{C}$  — 1,8.

Исследование кинетики изменений интенсивности долгоживущей ЗФ, световых зависимостей миллисекундной и быстрой флуоресценции, величины  $F_m/F_0$  показало, что у незакаленной хвои повреждение цепи электронного транспорта происходит уже в течение первых 0,5—1 ч охлаждения при  $-5^{\circ}\text{C}$  (рис. 3). Отношение  $F_m/F_0$  начинает уменьшаться во время первых 0,5 ч охлаждения в основном за счет уменьшения  $F_m$ . Световые зависимости

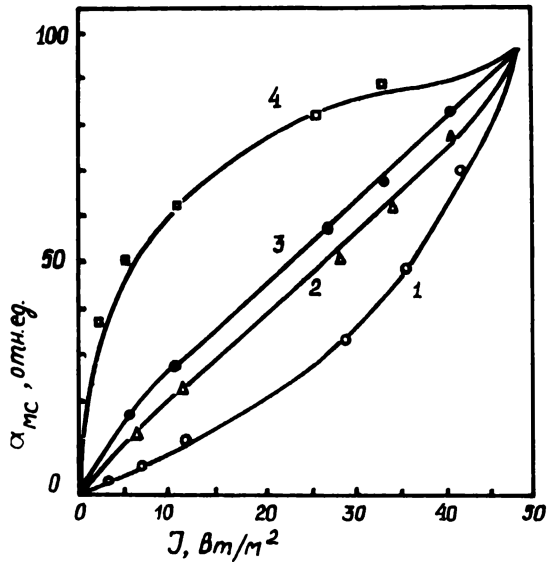


Рис. 2. Зависимость относительной интенсивности миллисекундной ЗФ ( $Z_{мс}$ ) хвои, нормированной к 100% освещенности, от интенсивности света ( $Y$ ):

1 — непосредственно после сбора, температура воздуха  $+15^{\circ}\text{C}$ ; 2 — после охлаждения до  $+4^{\circ}\text{C}$ ; 3 — после охлаждения до  $-5^{\circ}\text{C}$ ; 4 — после сбора, температура воздуха  $0^{\circ}\text{C}$

миллисекундной ЗФ начинают изменяться после 1 ч охлаждения. Интенсивность долгоживущей ЗФ в течение первого часа охлаждения возрастает, после чего резко падает. Ранее было установлено, что начальное увеличение интенсивности долгоживущего свечения характерно и для процесса нагревания хвои и листьев (Venediktov, 1984). По-видимому, начальные стадии повреждения кислородвыделяющей системы характеризуются процессами, приводящими к возрастанию интенсивности долгоживущего свечения.

Представляет интерес сравнение влияния резкого понижения температуры в естественных и в природных условиях. В период проведения исследований в октябре в течение одного дня резко похолодало, температура воздуха понизилась от  $10 \div 15^{\circ}\text{C}$  до  $0 \div -2^{\circ}\text{C}$ . В результате отношение  $F_{\infty}/F_0$  изменилось от 3,6 до 3,0, а интенсивность долгоживущего свечения уменьшилась в 4,6 раза. При этом световая зависимость миллисекундной ЗФ приобрела форму, аналогичную наблюдаемой при искусственном охлаждении хвои.

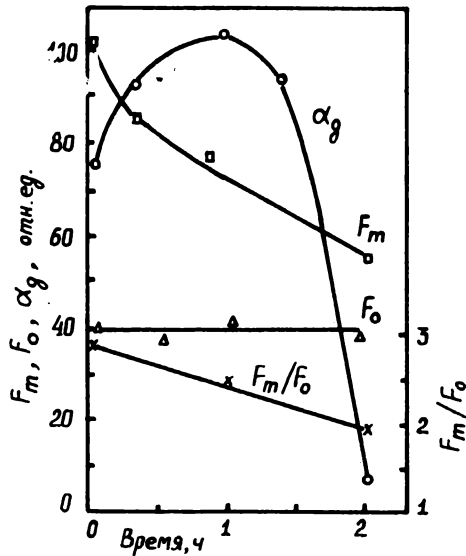


Рис. 3. Кинетика изменения параметров быстрой и замедленной флуоресценции хвои во время выдерживания при  $-5^{\circ}\text{C}$ :  $F_m$  и  $F_0$  — максимальный и нулевой уровни флуоресценции;  $L_g$  — интенсивность долгоживущей ЗФ

В природных условиях действию критических отрицательных температур предшествует период холодной адаптации, когда температура воздуха колеблется около  $0^{\circ}\text{C}$ . Состояние холодной адаптации индуцирует такие перестройки мембран хлоропластов хвои, благодаря которым хвойные сохраняют фотосинтетический аппарат при низких температурах и полностью восстанавливают его активность после установления положительных температур (Oquist, 1980).

Процессы ингибирования и восстановления активности фотосинтетического аппарата хвойных в природных условиях мы изучали в январе—октябре 1985 г. Результаты исследований приведены в таблице. Зимой интенсивность быстрой и замедленной флуоресценции была низкой, минимальные значения фиксировались в январе—феврале. В конце марта, при повышении температуры воздуха до  $0^{\circ}\text{C}$  интенсивность флуоресценции начала возрастать. В это время световая зависимость быстрой флуоресценции была линейной, что характерно для хлоропластов с закрытыми реакционными центрами, а отношение  $F_m/F_0$  было близко к 1. В апреле, когда температура воздуха достигла устойчивых

положительных значений, наблюдалось увеличение интенсивности быстрой флуоресценции. К июлю световая кривая быстрой флуоресценции приобрела форму, характерную для высших растений с активными фотосистемами I и II, отношение  $F_m/F_0$  увеличилось до 2,6.

Таким образом, охлаждение хвои в лабораторных и естественных условиях вызывает сходные изменения в цепи электронного транспорта хлоропластов. Причем у закаленной хвои эти изменения обратимы, тогда как быстрое охлаждение хвои, собранной в сентябре, приводит к необратимым изменениям в цепи электронного транспорта.

Увеличение температуры выше комнатной приводит к возрастанию интенсивности долгоживущей ЗФ. При температуре выше  $+45^\circ\text{C}$  свечение резко падает. Такая же зависимость интенсивности долгоживущего свечения от температуры характерна и для листьев высших растений. В качестве параметра, характеризующего тепловую устойчивость кислородвыделяющей системы, мы использовали температуру инактивации, т. е. температуру, при которой интенсивность долгоживущей ЗФ уменьшается до половины максимального значения. Для кислородвыделяющей системы хвои температура инактивации составляет  $48^\circ\text{C}$ , что несколько выше, чем у листьев гороха ( $45^\circ\text{C}$ ), но ниже, чем у листьев древесных растений ( $53\text{—}56^\circ\text{C}$ ) (Venediktov, 1983).

Термоиндуцированное возрастание нулевого уровня флуоресценции  $F_0$  регистрируется после нагрева до  $55\text{—}60^\circ\text{C}$ , уровни  $F_0$  и  $F_m$  становятся неразличимыми при температуре  $67\text{—}70^\circ\text{C}$ . Для сравнения хвойных с покрытосеменными в тех же условиях изучали термоиндуцированные изменения флуоресценции листьев гороха. Для гороха возрастание начинается после нагрева до  $50^\circ\text{C}$ , а  $\Delta F=0$  при  $60^\circ\text{C}$ , что соответствует данным, полученным на хлоропластах, изолированных из листьев гороха (Сорокина, 1985). Таким образом, по сравнению с покрытосеменными, кислородвыделяющая система и реакционные центры фотосистемы II хвойных более устойчивы к действию не только отрицательных, но и критических положительных температур.

Известно, что термостабильность растений можно увеличить посредством закалки, т. е. при выдерживании при сверхоптимальных, но сублетальных температурах (Ломагин, 1961). Исследование параметров флуоресценции показало, что закалка хвои происходит при той же температуре, что и закалка листьев покрытосеменных растений ( $37^\circ\text{C}$ ). Повышение термостабильности кислородвыделяющей системы хвои достигается при 2,5-часовом выдерживании при температуре инактивации  $48\text{—}52^\circ\text{C}$ , в то время как для такой же степени закалки листьев гороха необходимо 17 ч. Следует отметить, что повышения термостабильности реакционных центров фотосистемы II при этом не происходит.

Более длительное нагревание приводит к уменьшению интенсивности свечения, температура инактивации при этом понижается. После инкубации хвои при 37°C в течение 18 ч кислородвыделяющая система повреждается в значительной степени (интенсивность долгоживущей ЗФ уменьшается в 6 раз) (рис. 4). Одновременно происходит некоторое уменьшение величины  $F_m/F_0$  за счет уменьшения  $F_m$  ( $F_0$  практически не изменяется). Таким образом, на реакционные центры фотосистемы II данный тепловой режим влияет незначительно.

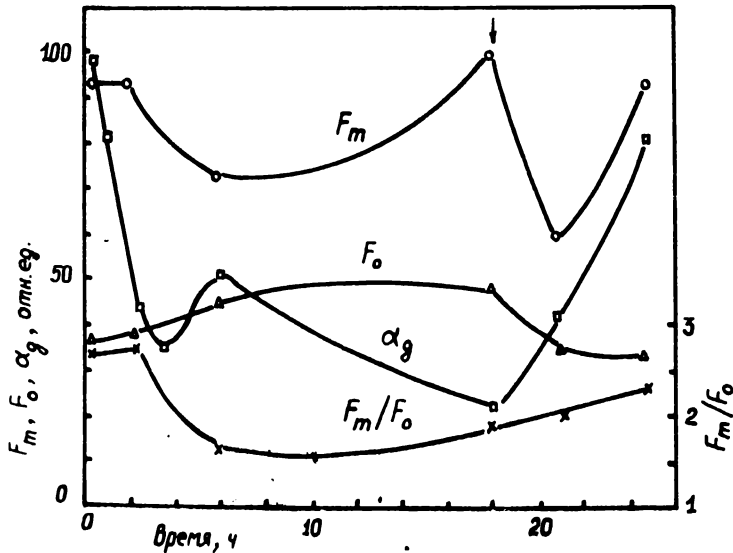


Рис. 4. Изменение параметров быстрой и замедленной флуоресценции в процессе закаливания хвои при 37°C и после прекращения теплового воздействия (переход к 24°C показан стрелкой)

Необходимо отметить важное отличие тепловой инактивации кислородвыделяющей системы хвойных и покрытосеменных растений: тепловое повреждение кислородвыделяющей системы хвойных обратимо, в то время как восстановления активности кислородвыделяющей системы листьев гороха после их тепловой обработки достигнуть не удастся. После 18-часовой инкубации хвои при 37°C восстановление отношения  $F_m/F_0$  и интенсивности долгоживущего свечения происходит через 6 ч выдерживания хвои при комнатной температуре (см. рис. 4).

Таким образом, наблюдается ряд особенностей реакции фотосинтетического аппарата хвои на изменение температурных условий по сравнению с покрытосеменными растениями. Характер этих реакций может зависеть от времени года, т. е. от адапта-



ции фотосинтетического аппарата к условиям окружающей среды. Данная работа была проведена в начале октября, когда полная адаптация хвои к низким температурам еще не наступила.

Выдерживание хвои при отрицательных температурах, близких к  $0^{\circ}\text{C}$ , приводит к изменениям в цепи электронного транспорта хлоропластов, характерным для «зимнего стресса хвойных». Холодовые повреждения наступают уже через 0,5—1 ч охлаждения. Эти повреждения, вызванные искусственным охлаждением, необратимы. В то же время в естественных условиях, после окончания зимних холодов, активность фотосинтетического аппарата восстанавливается. Эти различия в реакции фотосинтетического аппарата хвойных на искусственное и естественное охлаждение обусловлены, очевидно, отсутствием периода холодной закалки в данных экспериментальных условиях. Отсутствие криопротекторов — сахарозы и низкомолекулярных белков, образуемых при холодной закалке (Santarius, 1973), — приводит, по-видимому, к необратимому повреждению фотосинтетического аппарата хвои.

Тепловая устойчивость хвои сравнима с тепловой устойчивостью листьев гороха, но ниже, чем у листьев древесных растений. Температуру тепловой инактивации кислородвыделяющей системы хвои можно повысить посредством закалки. Нагревание при  $37^{\circ}\text{C}$  сопровождается частичной инактивацией кислородвыделяющей системы, при этом интенсивность долгоживущей ЗФ начинает уменьшаться. Термостабильность активных центров фотосистемы II повышается на  $4^{\circ}\text{C}$  после 2,5 ч инкубации. Такое же повышение термостабильности листьев гороха достигается после 17 ч закалки при  $37^{\circ}\text{C}$ . Выдерживание хвои при  $37^{\circ}\text{C}$  свыше 2,5 ч приводит к дальнейшему повреждению кислородвыделяющей системы, при этом температура ее инактивации понижается. Тепловая инактивация хвои обратима. После 6 ч выдерживания при комнатной температуре все параметры быстрой и замедленной флуоресценции восстанавливаются практически до исходного уровня. Эта особенность кислородвыделяющей системы хвои обусловлена, вероятно, теми же факторами, что и способность к восстановлению после зимнего стресса, поскольку криопротекторы, такие как сахароза и низкомолекулярные белки, защищают хлоропласты и от тепловой инактивации (Santarius, 1973). Осенью концентрация этих веществ повышается, и хотя в октябре их количества еще недостаточно для защиты от действия отрицательных температур, они могут быть причиной обратимости тепловой инактивации кислородвыделяющей системы.

Таким образом, кислородвыделяющая система и реакционные центры фотосистемы II хвои сосны сибирской по сравнению с некоторыми покрытосеменными более устойчивы к действию

как отрицательных, так и критических положительных температур. При этом тепловое повреждение кислородвыделяющей системы хвойных обратимо.

## ЛИТЕРАТУРА

- Ломегин А. Г. Изменение устойчивости растительных клеток после кратковременного действия высокой температуры // Цитология. 1961. № 3. С. 426—436.
- Сорокина Г. А., Гаевский Н. А., Гольд В. М. Перспективы использования флуоресценции хлорофилла для оценки устойчивости фотосинтетического аппарата к действию высоких температур // Физиология и биохимия культурных растений. 1985. Т. 17, № 2. С. 126—130.
- Baner H., Larcher W., Walker R. B. Influence of temperature stress on CO<sub>2</sub> gas exchange // Photosynthesis and productivity in different Environments / Ed. G. P. Cooper. Cambridge, 1975. P. 557—586.
- Cox R. P. Oxygen evolution at sub-zero temperatures by chloroplasts, suspended in fluid media // FEBS Letters. 1975. № 57. P. 117—119.
- Hall D. O. Photosynthetic phosphorylation above below  $q$  // Dissertation abstract 1963. № 24. P. 4962—4963.
- Oquist G. Effects of artificial frost hardening and winter stress on net photosynthesis in seedlings of *Pinus silvestris* // Physiol. Plant. 1980. N 48. P. 526—531.
- Puckacki P., Veselovsky V. A., Veselova T. V. Effect of cold deacclimation on delayed fluorescence of spruce needle // Z. Pflanzenphysiol. 1983. N 109. P. 267—273.
- Santarins K. A. The protective effects of sugars on chloroplast membranes during temperature and water stress and its relationship to frost, desiccation and heat resistance // Planta. 1973. № 114. P. 105—114.
- Shreiber U., Armond P. A. Heat-induced changes in chlorophyll fluorescence in isolated chloroplasts and related heat — damage at the pigment level // Biochim. et biophys. Acta. 1978. № 502. P. 138—151.
- Venediktov P. S., Krivoshejeva A. A. The mechanism of fatty-acid inhibition of electron transport in chloroplast // Planta. 1983. № 159. P. 411—414.