

УДК 577.355

Р. Г. ГОНЧАРИК, В. П. ДОМАНСКИЙ, Н. В. ШАЛЫГО

**ПЕРЕМЕННАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА ЛИСТЬЕВ ЯЧМЕНЯ
(*HORDEUM VULGARE*) ПРИ ПОВЫШЕННОМ СОДЕРЖАНИИ CO₂
В УСЛОВИЯХ ИНГИБИРОВАНИЯ КАРБОАНГИДРАЗЫ
И ФЕРМЕНТОВ ЦИКЛА КАЛЬВИНА**

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, e-mail: rusgon@mail.ru

(Поступила в редакцию 19.12. 2013)

Введение. Фиксация углерода – важнейший этап темновых реакций фотосинтеза, определяющий фотосинтетическую продуктивность растений. Основным его субстратом, потребляемым из окружающей среды, является углекислый газ (CO₂). До начала промышленной революции содержание углекислого газа в атмосфере составляло 280 ppm (0,028 %). К настоящему моменту оно возросло до 393 ppm (0,0393 %) и продолжает увеличиваться [1].

Из литературы известно, что повышение содержания углекислого газа оказывает стимулирующее действие на фотосинтетический электронный транспорт, взаимодействуя в виде иона бикарбоната с акцепторной стороной [2] и с донорной стороной фотосистемы 2 [3]. Данные сообщения привели к большому числу попыток по выращиванию растений в искусственной атмосфере с повышенным содержанием углекислого газа, имевших целью увеличить их продуктивность. Однако большинство этих попыток не дало существенного экономического результата. Было установлено, что высокие концентрации углекислого газа угнетающе действуют на фотосинтез высших растений [4]. В то же время механизмы ингибирующего действия высоких концентраций углекислого газа на фотосинтез растений до сих пор полностью не установлены.

Целью данной работы являлось изучение механизмов угнетающего действия повышенного содержания углекислого газа на активность фотосистемы 2. Для этого было исследовано влияние повышенных концентраций CO₂ на показатели кривых индукции флуоресценции хлорофилла листьев ячменя, подвергнутых воздействию ингибиторов карбоангидразы и ферментов цикла Кальвина.

Объекты и методы исследования. В качестве объектов исследования использовали зеленые листья 7-дневных проростков ячменя *Hordeum vulgare* L., выращенных в режиме 14 ч света (освещенность 4000 лк) и 10 ч темноты при температуре + 23±1 °С и при относительной влажности воздуха 60±5 %. Растения освещали белыми люминесцентными лампами Philips TL-D36W/765. В качестве метода исследования использовали метод индукции флуоресценции хлорофилла, основанный на явлении переменной флуоресценции хлорофилла, когда при увеличении интенсивности освещения объекта от слабого измерительного света до актиничного происходит увеличение интенсивности флуоресценции объекта от начального уровня F_0 до максимального F_m . Для регистрации кривых индукции флуоресценции хлорофилла использовали экспериментальную установку, собранную в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [5]. Для выявления влияния карбоангидразы и ферментов цикла Кальвина на электронный транспорт при повышенном содержании CO₂ сравнивали кривые индукции у контрольных листьев и листьев ячменя, подвергнутых воздействию гидрофильного ингибитора карбоангидразы – ацетазоламида (50 и 100 мМ), липофильного ингибитора карбоангидразы – этоксизоламида (0,4 мМ) и ингибитора фосфорibuлокиназы – гликолевого альдегида (50 мМ) [6]. Листья ячменя выдер-

живали на соответствующих растворах в темноте в течение 4 ч. Контрольные листья инкубировали в темноте в течение 4 ч на дистиллированной воде.

Результаты и их обсуждение. Исходя из простейшей модели фотосинтеза, можно было бы ожидать, что увеличение концентрации CO_2 в воздухе приведет к стимуляции его потребления в цикле Кальвина, увеличению оттока электронов из электрон-транспортной цепи и к более резкому снижению уровня флуоресценции хлорофилла из-за усиления тушащих свойств акцептора электронов в фотосистеме 2. Эксперимент, однако, показывает, что дело обстоит несколько иначе (рис. 1, *a*). При увеличении концентрации углекислого газа до 33 % после включения актиничного света наблюдается замедление тушения флуоресценции хлорофилла по сравнению с кривой, записанной в естественном воздушном окружении. Ранее данный эффект мы наблюдали и при более низких концентрациях углекислого газа вплоть до 1 % [7].

Наблюдаемый эффект может быть связан с активностью карбоангидразы и активностью ферментов цикла Кальвина. Карбоангидраза, катализирующая реакцию перехода молекулы углекислого газа в форму бикарбонатного иона, участвует в транспорте неорганического углерода внутри клетки. Мы исследовали динамику индукции флуоресценции хлорофилла листьев ячменя при резком повышении концентрации углекислого газа в условиях снижения активности карбоангидразы. Для этого использовали гидрофильный ингибитор карбоангидразы – ацетазоламид в концентрации 100 мМ (рис. 1, *б*), липофильный ингибитор карбоангидразы – этоксизоламид в концентрации 0,8 мМ (рис. 1, *в*) и смесь ацетазоламида и этоксизоламида в концентрациях 50 и 0,4 мМ соответственно (рис. 1, *г*). Как видно из рис. 1, обработка листьев ячменя ацетазоламидом приводит к появлению немонотонного характера тушения флуоресценции хлорофилла после включения актиничного света при записи кривой в естественном воздушном

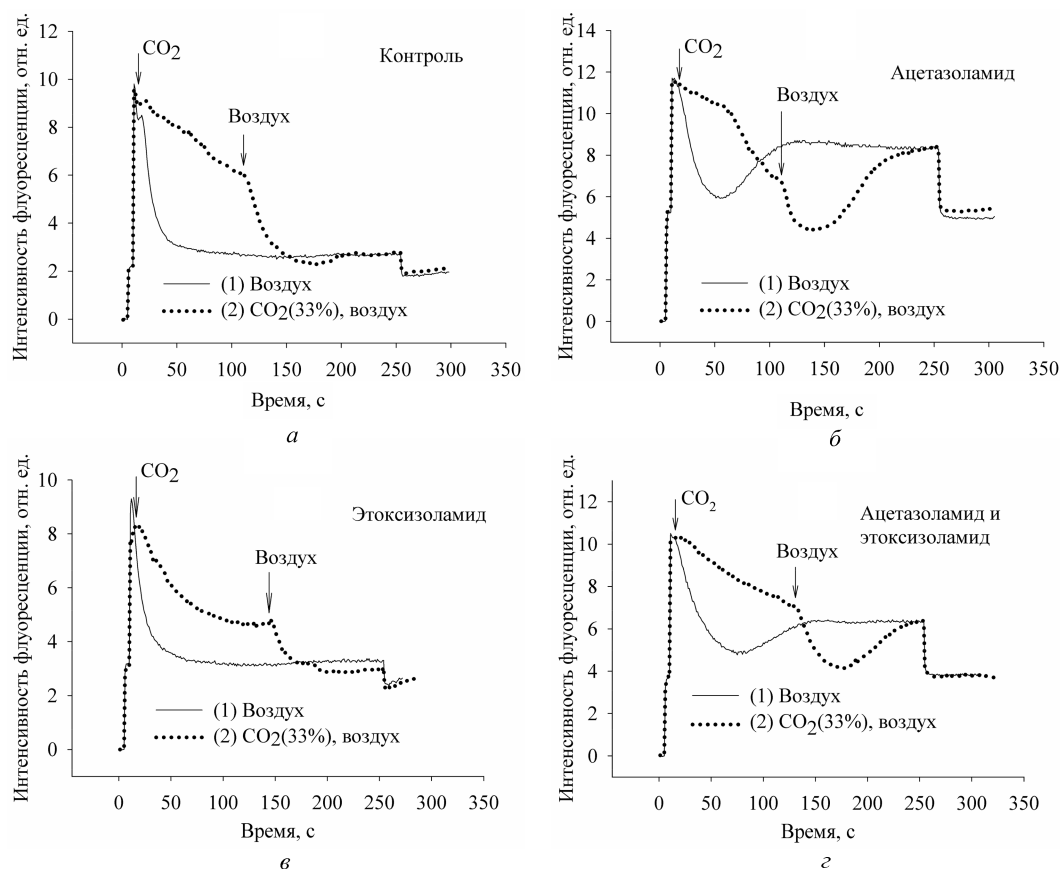


Рис. 1. Кривые индукции флуоресценции хлорофилла листьев ячменя после 4 ч инкубации на дистиллированной воде (*a*), на растворе ацетазоламида 100 мМ (*б*), на растворе этоксизоламида 0,8 мМ (*в*), на смеси ацетазоламида 50 мМ и этоксизоламида 0,4 мМ (*г*). Кривые (1) записаны, когда листья находились в естественном воздушном окружении. При записи кривых (2) кювету с листьями продували газовой смесью с 33%-ным содержанием CO_2 с последующим переходом к естественному воздушному окружению (здесь и далее показано вертикальными стрелками)

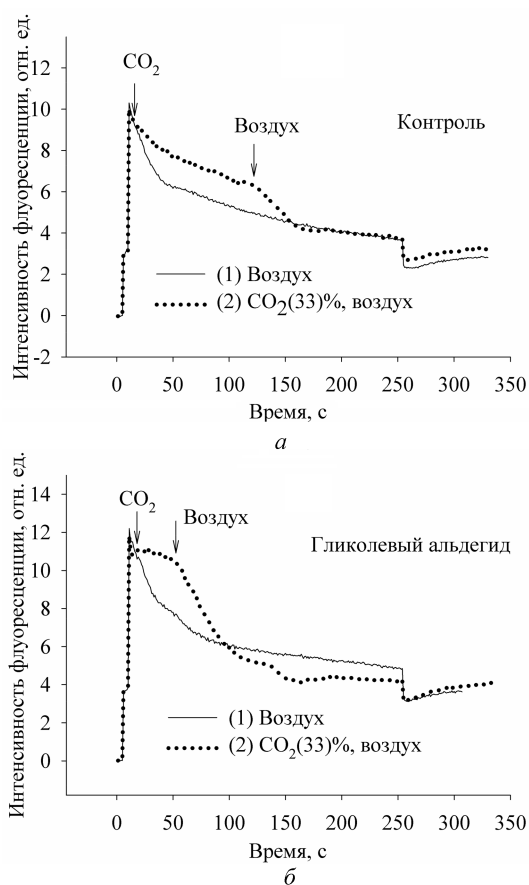


Рис. 2. Кривые индукции флуоресценции хлорофилла листьев ячменя после 4 ч инкубации на дистиллированной воде (а) и на растворе гликолевого альдегида 50 мМ (б). Кривые (1) записаны, когда листья находились в естественном воздушном окружении. При записи кривых (2) кювету с листьями продували газовой смесью с 33%-ным содержанием CO_2 с последующим переходом к естественному воздушному окружению

Углекислый газ является субстратом цикла Кальвина, поэтому в данной работе исследовали влияние снижения активности этого цикла на динамику индукции флуоресценции хлорофилла, вызванную резким повышением концентрации углекислого газа. Для этого использовали гликолевый альдегид, являющийся ингибитором фосфорибулокиназы, которая служит одним из ферментов цикла Кальвина [8].

Как видно из рис. 2, в листьях ячменя, инкубированных на растворе гликолевого альдегида в концентрации 50 мМ, наблюдается замедление тушения флуоресценции хлорофилла (кривая 2, рис. 2, б), вызванное резким повышением концентрации углекислого газа, аналогичное замедлению тушения флуоресценции хлорофилла, наблюдаемому в контрольных листьях (кривая 2, рис. 2, а). Из полученных результатов можно сделать вывод, что нарушение работы цикла Кальвина за счет ингибирования фермента фосфорибулокиназы в листьях ячменя практически не влияет на динамику индукции флуоресценции хлорофилла, вызванной резким повышением концентрации углекислого газа после включения актиничного света.

Заключение. Эффект замедления тушения флуоресценции хлорофилла при резком повышении концентрации углекислого газа не вызван изменением функционирования цикла Кальвина или фермента карбоангидразы. На это указывает отсутствие действия ингибиторов карбоангидразы и цикла Кальвина на кинетику индукционной кривой переменной флуоресценции. Выявленный эффект может быть обусловлен непосредственным влиянием повышенного содержания

окружении (кривая 1, рис. 1, б). Первые 50 с происходит понижение уровня флуоресценции хлорофилла, аналогичное тому, которое происходит у контрольного листа (кривая 1, рис. 1, а). Далее в опытном варианте, в отличие от контрольного, наблюдается рост интенсивности флуоресценции хлорофилла до уровня около $0,7F_m$. Учитывая, что ацетазоламид ингибирует карбоангидразу, данный ход кривой может быть легко объяснен. Так как нормальное функционирование карбоангидразы необходимо для обеспечения цикла Кальвина достаточным количеством углекислоты, то ингибирование карбоангидразы приводит к недостатку углекислоты в центрах карбоксилирования и, соответственно, к уменьшению количества энергии, потребляемой циклом Кальвина. А это приводит к увеличению числа восстановленных форм переносчиков электронов в электрон-транспортной цепи, что и отражается на ходе кривой в виде повышения интенсивности флуоресценции до уровня около $0,7F_m$. При записи кривых индукции флуоресценции хлорофилла с продуванием камеры с листьями ячменя газовой смесью с повышенным содержанием углекислого газа наблюдаются схожие эффекты замедления тушения флуоресценции как в контрольных листьях (кривая 2, рис. 1, а), так и в листьях, обработанных ацетазоламидом (кривая 2, рис. 1, б), этоксизоламидом (кривая 2, рис. 1, в) и смесью ацетазоламида и этоксизоламида (кривая 2, рис. 1, г). Таким образом, можно утверждать, что ингибирование карбоангидразы в листьях ячменя практически не влияет на изменение индукции флуоресценции хлорофилла, вызванное резким повышением концентрации углекислого газа после включения актиничного света.

углекислого газа на электрон-транспортную цепь. По крайней мере, ранее нами было показано [9], что повышение концентрации углекислого газа может препятствовать миграции лабильных светособирающих комплексов от фотосистемы 2 к фотосистеме 1 на свету высокой интенсивности.

Литература

1. *Tans P.* // Trends in Atmospheric Carbon Dioxide [Electronic resource]. Mode of access: <http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/mlo.html> – Date of access: 28.11.2013.
2. *Van Rensen J. J. S., Xu C. H., Govindjee.* // Plant Physiol. 1999. Vol. 105. P. 585–592.
3. *Klimov V. V., Allakhverdiev S. I., Feyziev Ya. M. и др.* // FEBS Lett. 1995. Vol. 363. P. 251–255.
4. *Reuveni J., Bugbee B.* // Annals of Botany. 1997. Vol. 80. P. 539–546.
5. *Гончарик П. Г., Доманский В. П.* // Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 2. С. 69–72.
6. *Іванов В. N., Ignatova L. K., Romanova A. K.* // Russian Journal of Plant Physiology. 2007. Vol. 54, N 2. P. 143–162.
7. *Гончарик П. Г., Доманский В. П., Козел Н. В.* // Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2014. № 3. С. 38–43.
8. *Takahashi S., Murata N.* // Biochimica et Biophysica Acta. 2005. Vol. 1708. P. 352–361.
9. *Гончарик П. Г., Доманский В. П., Козел Н. В.* // Сб. X междунар. науч. конф. «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем». Мн., 2012.

R. G. GONCHARIK, V. P. DOMANSKII, N. V. SHALYGO

THE VARIABLE CHLOROPHYLL FLUORESCENCE OF BARLEY LEAVES (*HORDEUM VULGARE*) AT RISING CO₂ CONTENT IN THE CONDITIONS OF INHIBITION OF CARBONIC ANHYDRASE AND ENZYMES OF CALVIN CYCLE

Summary

The inhibition of carbonic anhydrase and Calvin cycle in barley leaves was shown to not influence the chlorophyll fluorescence quenching slowdown due to sharp rising of carbon dioxide content in atmosphere.