

AGRICULTURE

Зміни вмісту пігментів та структурних протеїнів мембран хлоропластів у різних сортів озимої пшениці за дії посухи

О. Ю. Бондаренко, В. В. Шевченко

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, м. Київ, Україна
*Corresponding author Shevchenko V.V. E-mail: biochemkiev@ukr.net

Paper received 29.06.21; Accepted for publication 18.07.21.

<https://doi.org/10.31174/SEND-NT2021-255IX32-01>

Анотація. Досліджено вміст хлорофілів та структурних протеїнів мембран хлоропластів у сортів озимої пшениці різної стійкості у контролі та за дії 7-ми денної посухи. Встановлено, що більш стійкі сорти відрізнялись підвищеним вмістом низькомолекулярних захисних протеїнів у контролі. За дії посухи всі сорти втрачали хлорофіл та основні структурні протеїни. Ця втрата була більшою у менш стійких сортів. При цьому відносний вміст низькомолекулярних захисних протеїнів збільшувався. Таким чином показано, що вміст протеїнів 36, 21 та 16 кДа може бути одним із молекулярних маркерів посухостійкості.

Ключові слова: *Triticum aestivum L.*, озима пшениця, структурні протеїни фотосинтетичного апарату, пігменти, посуха.

Вступ. Озима пшениця – одна з основних стратегічних культур людства [1], на врожайність якої впливають різні стресові чинники [2]. Особливе місце серед абіотичних факторів, що впливають на ріст, розвиток та продуктивність рослин, посідає посуха [3]. Втрати врожаю пшениці, за різних умов посухи, можуть складати від 30 до 90 % [4]. За водного дефіциту, в першу чергу, відбувається закриття продихів, що призводить до порушення транспірації і, як наслідок, до перегріву листка [5]. Найбільш чутливими до дії підвищених температур є фотосистема II (ФС II), електронний транспорт та Рубіско-активаза [5, 6]. Внаслідок порушення транспорту електронів, фотосинтетичним апаратом продукуються активні форми кисню, які можуть призводити до розвитку окислювального стресу та руйнування ряду фотосинтетичних структур [7]. Так, наприклад, однією з таких структур є білок D1, ресинтез якого блокується активними формами кисню [7]. Між тим, збереження електронного транспорту на високому рівні може значною мірою знизити продукування активних форм кисню і запобігти розвитку окислювального стресу. У рослин існує декілька механізмів, які здатні підтримувати електронний транспорт за умов посухи. Такими механізмами є фотодихання та циклічний транспорт електронів [5, 7]. Також, останнім часом, вважається, що пластохінол-оксидаза (РТОХ) може виступати, як певний “клапан”, який дозволяє відбирати надлишкові електрони з електрон-транспортного ланцюга, тим самим зберігаючи електронний транспорт через ФС II на високому рівні [8]. Оскільки відомо, що стійкість рослин до стресу значною мірою залежить від стійкості фотосинтетичного апарату, то можна припустити, що різна жаро-псухостійкість сортів озимої пшениці може визначатись саме збереженням високого функціонального стану фотосинтетичного апарату.

У зв'язку з цим, метою роботи було дослідження особливостей втрати пігмент-білкових комплексів хлоропластів різних за посухостійкістю сортів озимої пшениці за дії посухи, а також визначення продукування захисних низькомолекулярних протеїнів в цих

сортах.

Матеріали та методи. Для досліджень використані чотири сорти озимої пшениці різної жаро-псухостійкості. При сортовипробуванні вони отримали наступну оцінку: Перлина Лісостепу - 5-6 балів, Достаток – 7-8 балів, Подолянка - 8 балів та Одеська 267 - 8,5-9 балів.

Озиму пшеницю досліджуваних сортів висівали на дослідних ділянках Інституту фізіології рослин і генетики НАН України розміром 3x1 м у вересні місяці. Грунт - сірий дерново-підзолистий. Внесення NPK - стандартне за технологією вирощування. Після перезимівлі у відкритому ґрунті рослини було пересаджено у 10-ти кг вегетаційні посудини. Для контрольних рослин здійснювали полив для забезпечення 60-70% повної вологості ґрунту. Для дослідних рослин на фазі цвітіння створювались умови посухи протягом 7 днів при 30% повної вологості (ПВ).

Для виділення хлоропластів відбирали прапорцеві листки. Листки гомогенізували 2 хвилини на гомогенізаторі MPW - 302 (Польща) в середовищі, що містило 50 мМ трицину рН 7,6, 0,4 М сахарози, 10 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂. Після чого гомогенат пропускали через 2 шари бязі та центрифугували на центрифугу Eppendorf 5810 (Німеччина) 5 хвилин зі швидкістю 400g для осадження великих фрагментів клітин. Супернатант центрифугували вдруге протягом 10 хвилин зі швидкістю 1000g, отримуючи в осаді фракцію хлоропластів. Осад ресуспендували, пропускаючи його через капрон, в 10 мМ трициновому буфері рН 7,6 з додаванням 0,1 М сахарози, 10 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂.

Електрофорез хлорофіл-білкових комплексів проводили у поліакриламідному гелі [9]. Розподільний гель містив 12 % акріламід, 0,1% бісакріламід, 6 М сечовину, 0,375 М Tris-HCl (рН 8,9), 0,003 % персульфату амонію, 0,0003 % TEMED. Концентруючий гель містив 8 % акріламід, 0,1 % бісакріламід, 6 М сечовину, 0,175 М Tris-HCl (рН 6,8), 0,003 % персульфату амонію, 0,0003 % TEMED. Гель фарбували органічним барвником Brilliant Blue R в водному роз-

чині 10 % оцтової кислоти з додаванням 30% етанолу 12 годин при кімнатній температурі. Обезбарвлювання гелю проводили в водному розчині, що містив 10% етанолу та 10% оцтової кислоти. Пластинки гелю сканували на сканері "Mustek ScanExpress 12000P", реєстрограми обробляли за допомогою комп'ютерної програми обробки гелей "ScnImage". Для ідентифікації смуг використовували суміш маркерних білків фірми "SIGMA", USA.

Вміст пігментів у листках визначали за Wellburn [10].

Біологічна та аналітична повторюваність дослідів – триразова.

Результати та обговорення. В таблиці 1 представлені результати вимірювання вмісту пігментів в листках різних сортів озимої пшениці за дії 7-ми денної посухи. З наведених результатів видно, що за дії посухи у всіх сортів вміст хлорофілу у листках знижувався. Для більш стійких сортів, Подолянка та Одеська 267, це зниження було незначним. У менш стійких сортів, Достаток та Перлина Лісостепу, спостерігалось значне зниження вмісту хлорофілу.

Таблиця 1. Зміни вмісту пігментів в листках різних сортів озимої пшениці за дії посухи.

варіант		Хлорофіл, мг/г	Каротиноїди, мг/г	Хл/Кар
Одеська 267	Контроль	3,59±0,04	0,43±0,02	8,35±0,03
	Посуха	3,26±0,04	0,45±0,02	7,24±0,03
Подолянка	Контроль	3,79±0,05	0,41±0,02	9,24±0,05
	Посуха	3,49±0,01	0,43±0,02	8,11±0,02
Достаток	Контроль	3,69±0,07	0,39±0,05	9,46±0,07
	Посуха	2,39±0,09	0,57±0,10	4,19±0,10
Перлина Лісостепу	Контроль	3,73±0,17	0,38±0,10	9,81±0,12
	посуха	2,12±0,05	0,64±0,14	3,31±0,22

Вміст каротиноїдів, навпаки, дещо збільшувався у більш стійких сортів. У менш стійких сортів збільшення вмісту каротиноїдів було досить значним. Співвідношення хл/кар, за дії посухи, зменшувалось у всіх сортів, як за рахунок втрачання хлорофілів, так і за рахунок збільшення вмісту каротиноїдів. Підвищення вмісту каротиноїдів пов'язують із старінням

або впливом стресових чинників [11]. Тобто, з одержаних даних можна зробити висновок, що нестійкі сорти озимої пшениці відчували більш значний стрес ніж стійкі сорти.

В таблиці 2 представлені зміни вмісту основних протеїнових комплексів фотосистеми II за дії 7-ми денної посухи.

Таблиця 2. Зміни відносного вмісту основних протеїнових комплексів фотосистеми II в хлоропластах різних сортів озимої пшениці за дії 7-ми денної посухи (% від загального білку хлоропластів).

варіант		CP 47	CP 43	D ₁ /D ₂	СЗК II
Одеська 267	Контроль	3,70±0,27	2,20±0,21	6,38±0,28	18,53±0,21
	Посуха	3,52±0,30	2,07±0,22	6,08±0,30	17,73±0,30
Подолянка	Контроль	3,73±0,21	2,45±0,16	7,32±0,35	18,67±0,21
	Посуха	3,53±0,24	2,15±0,20	6,92±0,35	17,77±0,29
Достаток	Контроль	4,80±0,28	3,18±0,12	6,81±0,28	21,57±0,20
	Посуха	4,00±0,38	2,28±0,18	6,01±0,33	19,29±0,28
Перлина Лісостепу	Контроль	5,99±0,16	3,85±0,14	7,00±0,31	23,98±0,19
	посуха	4,87±0,18	2,05±0,20	5,88±0,33	20,16±0,27

Аналіз відмінностей по сортам показав різну наповненість протеїнами фотосинтетичної системи хлоропластів. Первинна фотореакція ФС II локалізована на гетеродимері D₁/D₂. Саме білки D₁/D₂ утворюють активний реакційний центр ФС II. Зона наповнення цими білками в контрольних варіантах хлоропластів рослин пшениці знаходиться в чисельно близьких значеннях. Вважається, що для стабілізації розділених зарядів в реакційному центрі ФС II обов'язкова кооперація внутрішньої та периферійної антен (CP47 та CP 43). З таблиці видно, що співвідношення внутрішньої та периферійної антен (зони CP47 та CP 43) коливаються в близьких межах ≈1,5 по всім досліджуваним сортам.

Вплив 7-ми денної посухи на рослини призводив до змін у вмісті білків хлоропластів. Аналіз вмісту протеїнів хлоропластів показав, що зниження функціональної активності переважно обумовлене руйнуванням білку реакційного центру D1, а також антенного білку CP 47 у всіх досліджуваних сортів, але в різному ступені, в ланцюгу від більшого до меншого: Перлина Лісостепу-Достаток-Подолянка-Одеська 267. Також у всіх сортів знижувався вміст антенного білку

CP 43 та білків СЗК II. В таблиці не представлені білки, які належать комплексу ФС I, оскільки їх вміст практично не змінювався.

В таблиці 3 представлено зміни вмісту низькомолекулярних захисних протеїнів 36, 21, 16 та 14 кДа. Білок 36 кДа - так звана пластохінолоксидаза, білок 21 кДа - водорозчинний хлорофіл-білок що стабілізує ФС II, білок 16 кДа сприяє тримеризації ФС I та її стабілізації, білок 14 кДа необхідний для забезпечення необхідної конформації для щільного зв'язування Ca⁺⁺ та Cl⁻. Наповнення зон цих протеїнів в контрольних варіантах показує зменшення їх вмісту по ланцюгу: Одеська 267 – Подолянка – Достаток – Перлина Лісостепу.

Виявлено, що пул пластохінону може приймати участь в переносі електронів по механізму хлоропластного дихання (chlororespiration) за участю пластидної термінальної оксидази, (англ. PTOX - Plastid Terminal Oxidase) [12]. Показано, що в хлоропластах рослин томатів та арабідопсису при високотемпературному стресі вміст PTOX підвищується [13]. Активізація циклічного транспорту може бути викликана структурною реорганізацією тилакоїдної системи хлоропласт-

тів при дії стресів. На сьогоднішній день, РТОХ ідентифіковано як новий окисно-відновлювальний компонент, пов'язаний з циклічним та лінійним транспортом. Дані літературних джерел указують на подвійну роль РТОХ: 1 – її активність необхідна для ефективної десатурації каротиноїдів в листках на певних ета-

пах розвитку рослинного організму, але не на всіх, що передбачає існування незалежного від пластидної термінальної оксидази шляху для повторного окислення пластохінола в поєднанні з фітоєнною десатуразою; 2 – РТОХ бере участь в механізмі фотодихання в зелених тканинах рослин [14].

Таблиця 3. Зміни вмісту низькомолекулярних протеїнів в хлоропластах різних сортів озимої пшениці за дії 7-ми денної посухи. (% від загального білку хлоропластів).

варіант		36 кДа, %	21 кДа, %	16 кДа, %	14 кДа, %
Одеська 267	Контроль	10,24±0,12	9,68±0,38	11,04±0,34	5,92±0,33
	Посуха	11,22±0,30	12,6±0,53	13,06±0,21	7,11±0,43
Подольянка	Контроль	7,83±0,11	9,44±0,22	8,14±0,09	5,67±0,20
	Посуха	8,54±0,20	11,22±0,38	10,22±0,51	7,23±0,41
Достаток	Контроль	7,65±0,23	8,03±0,21	7,82±0,30	5,82±0,23
	Посуха	8,13±0,15	11,8±0,25	9,40±0,21	7,55±0,12
Перлина Лісостепу	Контроль	5,99±0,32	6,6±0,31	4,05±0,30	3,38±0,34
	посуха	5,91±0,23	11,20±0,22	6,07±0,52	4,55±0,32

Аналіз вмісту даного протеїну в хлоропластах з рослин пшениці, на які було накладено дію 7-ми денної посухи, показав збільшення наповнюваності зони протеїну 36 кДа, але в різному ступені. Щодо більш посухостійких сортів, то в хлоропластах з прапорцевих листків рослин пшениці озимої сортів Подольянка та Одеська 267 відносний вміст даного протеїну (36 кДа) після 7-ми днів посухи був більший на 10% ніж в контрольних варіантах.

В хлоропластах листків рослин сорту Достаток, цей показник збільшувався на 6 % від загального хлоропластного білку, а в сорті Перлина Лісостепу, при тому, що збільшення спостерігали до 21 %, в варіанті 7-ми денної посухи, відносний вміст протеїну 36 кДа все ж таки був нижчим за контрольні варіанти посухостійких сортів. З цього випливає, що дійсно, показник вмісту даного протеїну відноситься до параметрів, які пов'язані з рівнем толерантності до водного дефіциту, та може бути використаним при селекційних роботах на посухостійкість.

Дослідження адаптацій рослин до осмотичних стресів виявили присутність білків 20-22 кДа, що має гомологію з WSCP (WSCP – water-soluble chlorophyll-protein) – водорозчинний хлорофіл-білок, що індукується сольовим стресом. Раніше було показано, що накопичення мРНК-22 поліпептиду індукується сольовим стресом та посухою [15]. Передбачено, що цей білок зменшує протеазну активність в адаптованих до

посухи листках [16]. З таблиці видно, що посуха посилює також синтез протеїнів 16, 14 кДа. Позначені поліпептиди відносяться до ранніх світлоіндукованих протеїнів, які функціонально можуть бути задіяні в механізмах стійкості до посухи та високих температур. В контрольних варіантах вміст цих протеїнів, так само як і для протеїнів РТОХ, розташований в ланцюгу від меншого до більшого: Перлина Лісостепу – Достаток – Подольянка - Одеська 267. В стресових умовах, в тому числі й при гіпертермії, абсорбована хлорофілом енергія, яка не може бути повністю використана в фотосинтетичних реакціях, викликає окисне пошкодження клітин за участю активних форм кисню та вільних радикалів. Тому, вміст таких захисних протеїнів, як РТОХ, який підтримує електронний транспорт на високому рівні, має велике значення для збереження високої функціональної активності в умовах стресу.

Висновки. Посухостійкі сорти озимої пшениці відрізняються збільшеним вмістом низькомолекулярних захисних протеїнів, 36, 21, 16 та 14кДа, у контрольних рослинах. За дії посухи ці сорти втрачають менше пігментів та основних структурних протеїнів фотосистеми II. При цьому відносний вміст низькомолекулярних захисних протеїнів збільшується. Таким чином показано, що вміст протеїнів 36, 21 та 16 кДа може бути одним із молекулярних маркерів посухостійкості.

ЛІТЕРАТУРА

1. Rauf, S., Al-Khayri, J.M., Zaharieva, M., Monneveux, P. and Khalil, F. Breeding strategies to enhance drought tolerance in crops. In: Al-Khayri, J.M., Jain S.M. and Johnson D.V. (eds.) *Advances in plant breeding strategies. Agronomic, abiotic and biotic stress traits*. 2015.
2. Lesk C., Rowhani P., Ramankutty N. Influence of extreme weather disasters on global crop production // *Nature*, 2016. 529(7584). P. 84-87.
3. IPCC: Summary for policymakers. Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Pt. A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Field C.B., Barros V.R., Dokken D.J., Mach K.J., Mastrandrea M.D., Bilir T.E., Chatterjee M., Ebi K.L., Estrada Y.O., Genova R.C., Girma B., Kissel E.S., Levy A.N., MacCracken S., Mastrandrea P.R., White L.L. (Eds.). New York, USA: Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, 2014. P. 1-32.
4. Zulkiffal M., Ahsan A., et al. Heat and Drought Stresses in Wheat (*Triticum aestivum* L.): Substantial Yield Losses, Practical Achievements, Improvement Approaches, and Adaptive Mechanisms 2021DOI: [10.5772/intechopen.92378](https://doi.org/10.5772/intechopen.92378) In book: *Plant Stress Physiology*.
5. Кириций Д.А., Стасик О.О., Прядкина Г.А., Шадчина Т.М. Ассимиляция CO₂ и механизмы ее регуляции. Фотосинтез. Том 2. К.: Логос, 2014. 480 с.
6. Murata N., Takahashi S., Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress // *Biochem. et Biophys. Acta.*, 2007. 1767(6). P. 414–421.
7. Креславский В.Д. Карпентер П., Климов В.В., Мурата Н., Аллахвердиев С.И. Молекулярные механизмы устойчивости фотосинтетического аппарата к стрессу // *Биологические мембраны*, 2007. 3. С. 195-217.
8. Allison E. et al. Flexibility in photosynthetic electron

- transport: The physiological role of plastoquinol terminal oxidase (PTOX) // Biochem. et Biophys. Acta., 2011. 1807. P. 954–967.
9. Anderson J.M. The Grana Margins of Plant Thylakoid Membranes // Physiol. Plant. 1989. V.76. P. 243-248.
10. Wellburn A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total Carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution // Journal Plant Physiology. 1994. V. 144. P. 307-313.
11. Vermaas W. Molecular-biological approaches to analyze photosystem 2 structure and function // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1993. 44. P. 457-481.
12. Bukhov N.G., Carpentier V.V. Alternative Photosystem I-Driven Electron Transport Routes: Mechanisms and Functions // Photosynthesis Research. 2004. V.82. P. 17-33.
13. Fu A., Park S., Rodermeil S. Sequences required for the activity of PTOX (IMMUTANS), a plastid terminal oxidase: in vitro and in planta mutagenesis of iron-binding sites and a conserved sequence that corresponds to Exon 8 // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 42489-42496.
14. Shahbazi M., Gilbert M., Laboure A., Kuntz M. Dual Role of the Plastid Terminal Oxidase in Tomat // Plant Physiol. 2007. V. 145. P. 691–702.
15. Xiong L., Schumaker K.S., Zhu J.-K. Cell signaling during cold, drought and salt stress // Plant cell. 2002. V. 14. P. 165-183.
16. Ilami R. Water-Soluble Chlorophyll Protein in Brassicaceae Plants is a Stress-Induced Chlorophyll-Binding Protein // Plant and Cell Physiology. 2001. V.42. P. 906–911.

REFERENCES

5. Kirizy D.A, Stasik O.O., Pryadkina G.O., Shadchina T.M. Assimilation of CO₂ and mechanisms of its regulation. Photosynthesis. V 2. Kyiv: Logos, 2014. 480 p.
7. Kreslavsky V.D. Karpentier R., Klimov V.V., Murata N., Allahverdiev S.I. Molecular mechanisms of stability of photosynthetic apparatus for stress // Biological membranes, 2007. (3). P. 195-217.

Changes in the content of pigments and structural proteins of chloroplast membranes in different varieties of winter wheat under the influence of drought

O. Yu. Bondarenko, V. V. Shevchenko

Abstract. The content of chlorophylls and structural proteins of chloroplast membranes in winter wheat varieties of different resistance in the control and under the action of 7-day drought was studied. It was found that the more resistant varieties had an increased content of low molecular weight protective proteins in the control. During the drought, all varieties lost chlorophyll and basic structural proteins. This loss was greater in less resistant varieties. The relative content of low molecular weight protective proteins increased. Thus, it is shown that the protein content of 36, 21 and 16 kDa can be one of the molecular markers of drought resistance.

Keywords: *Triticum aestivum L.*, winter wheat, structural proteins of the photosynthetic apparatus, pigments, drought.