

AGRICULTURE

Зміни параметрів індукції флуоресценції хлорофілу та вмісту захисних низькомолекулярних протеїнів у сучасних сортів озимої пшениці за дії посухи

В. В. Шевченко*, О. Ю. Бондаренко

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

Paper received 04.02.22; Accepted for publication 12.03.22.

<https://doi.org/10.31174/SEND-NT2022-268X34-01>

Анотація. Вивчені зміни показників індукції флуоресценції хлорофілу та вмісту захисних низькомолекулярних протеїнів у чотирьох сортів озимої пшениці за дії посухи. Показано, що на сьомий день дії помірної посухи цінні сорти Подолянка, Порадниця та Подільська нива формують неспецифічну стійкість за рахунок підвищеного синтезу захисних протеїнів. Сильний, високобілковий сорт Наталка лише частково відновлював показники індукції флуоресценції та вирізнявся незначним збільшенням вмісту захисних протеїнів фотосинтетичного апарату.

Ключові слова: *Triticum aestivum L.*, озима пшениця, індукція флуоресценції хлорофілу, захисні низькомолекулярні протеїни фотосинтетичного апарату, посуха.

Вступ. Грунтова посуха є одним із факторів оточуючого середовища, який набуває особливого значення у зв'язку із глобальним потеплінням клімату [1]. Через посуху сільське господарство зазнає значних збитків. Так, для озимої пшениці, яка є однією з стратегічних продовольчих культур для людства, втрати врожайності через посуху можуть сягати 60-80 % [2]. Основною структурою рослинного організму, що страждає через вплив посухи є фотосинтетичний апарат. За дії посухи, в першу чергу, відбувається закриття продихів, що призводить до порушення транспірації [3]. Також чутливими до дії посухи та пов'язаним із нею підвищенням температури листка є кисень-виділяючий комплекс, фотосистема II, електрон-транспортний ланцюг та Рубіско-активаза [4]. Порушення електронного транспорту призводить до продукування активних форм кисню, які руйнують фотосинтетичний апарат. У рослини є кілька механізмів для запобігання дії осмотичного стресу. Це синтез антиоксидантних ферментів, які нейтралізують активні форми кисню [5]. Також є механізми, які дозволяють підтримувати електронний транспорт на високому рівні через залучення альтернативних акцепторів електронів таких, як процес фотодихання [3] та пластохінол-оксидази (РТОХ) [6], яка може виступати, як певний "клапан", що дозволяє відбирати надлишкові електрони з електрон-транспортного ланцюга. Для ряду сучасних сортів озимої пшениці показано формування перехресної стійкості при спільній дії посухи та підвищеної температури [7]. У зв'язку з загрозою для стабільності виробництва зерна, питання скринінгу генотипів пшениці на посухостійкість стає дедалі актуальнішим [8].

Тому, метою роботи було дослідження формування неспецифічної стійкості фотосинтетичного апарату у деяких цінних та сильних сортів озимої пшениці сучасної селекції.

Матеріали та методи. Для досліджень використані чотири сорти озимої пшениці сучасної селекції. Сорт Подолянка характеризується як сильний, має високу

екологічну пластичність, оцінка посухостійкості – 8 балів. Сорт Подільська нива – цінний, стійкість до посухи - 7-8 балів. Сорт Порадниця – цінний, оцінка посухостійкості 8-9 балів. Сорт Наталка – сильний, посухостійкість оцінюється як висока.

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 НРК - 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 молочно-воскової стиглості створювались умови посухи протягом 10 днів при 30% повної вологості (ПВ).

Індукцію флуоресценції вимірювали на однопromеневій установці, яку було зібрано у відділі. У якості джерела збуджуючого світла використовували світлодіод з максимумом випромінювання на довжині хвилі 450 нм, яку додатково виділяли за допомогою світлофільтра СЗС-3. Флуоресценцію вимірювали на довжині хвилі 685 нм, яку виділяли за допомогою монохроматора МДР-2, спектральна ширина інтервалу - 4-6 нм. Перед входною щільною монохроматора розміщували світлофільтр КС-14 для пригнічення розсіяного збуджуючого світла. Індукційні зміни флуоресценції починались після вмикання актинічного світла, час досягнення максимальної яскравості був менший за 1 мс. У реєструючий частині приладу використовувався фотопомножувач ФЭУ-79. Сигнал перетворювався за допомогою сконструйованого нами приймального блоку, який містить аналогово-цифровий перетворювач та інтерфейс для входу до ЕОМ типу ІВМ. Розроблене програмне забезпечення здійснює керування установкою, у тому числі вмиканням актинічного світла, переключенням режиму запису індукційних кривих. Мінімальний часовий інтервал між послідовними відборами значення сигналу дорівнював 200

мкс. Програмне забезпечення також дозволяло проводити інформаційну обробку даних для обчислення параметрів індукційної кривої. Зокрема відношення величини варіабельної флуоресценції до максимальної, F_v/F_m , яке, як відомо, є оцінкою квантового виходу фотохімії ФСII. Розрахунки проводили за даними 3-х біологічних повторностей.

Хлоропласти виділяли з прапорцевих листків за методикою, описаною раніше [6].

Електрофорез хлорофіл-білкових комплексів проводили у поліакриламідному гелі [9]. Розподільний гель містив 12 % акриламідну, 0,1% бісакриламідну, 6 М сечовину, 0,375 М Tris-HCl (pH 8,9), 0,003 % персульфату амонію, 0,0003 % TEMED. Концентруючий гель містив 8 % акриламідну, 0,1 % бісакриламідну, 6 М сечовину, 0,175 М Tris-HCl (pH 6,8), 0,003 % персульфату амонію, 0,0003 % TEMED. Гель фарбували органічним барвником Brilliant Blue R в водному розчині 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 гелів "ScnImage". Для ідентифікації смуг використовували суміш маркерних білків фірми "SIGMA", USA. Біологічна та аналітична повторюваність дослідів – триразова.

Результати та обговорення. Метою роботи було вивчення особливостей змін стану фотосинтетичного апарату у різних за посухостійкістю сортів озимої пшениці за дії посухи та формування у цих сортів неспецифічної стійкості фотосинтетичного апарату до стресових умов. Для цього рослини озимої пшениці, що вирощували в умовах вегетаційного дослідів, піддавали дії посухи на фазі молочно-воскової стиглості протягом 10-ти днів. Три дні з них уходило на досягнення 30-відсоткової вологості ґрунту. Таким чином відбір рослин проводили на 1-й та 7-й день, та досліджували показники індукції флуоресценції (таб. 1).

Таблиця 1. Параметри кривої індукції флуоресценції хлорофілу 1-й день посухи.

Сорт	F ₀ , ум.од.	F _p , ум.од.	F _{max} , ум.од.	F _{st} , ум.од.
Наталка, контроль	752±4	1140±12	1496±15	825±8
Наталка, посуха	758±5	1114±9	1364±13	780±11
Подільська нива, контроль	680±4	880±8	1290±13	739±12
Подільська нива, посуха	702±3	908±8	1275±11	762±14
Подольянка, контроль	716±5	998±9	1335±10	755±10
Подольянка, посуха	722±3	980±8	1330±10	785±10
Порадниця, контроль	724±4	1012±13	1385±7	786±11
Порадниця, посуха	755±8	1164±11	1482±8	855±10

З представленої таблиці видно, що за дії посухи підвищується рівень F₀, що говорить про збільшення рівня неактивних, «відкритих», реакційних центрів фотосистеми II, а також знижується рівень F_{max}, що говорить про погіршення переносу світлової енергії на реакційний центр фотосистеми II, та, як наслідок, зниження транспорту електронів на пластоцітон Q_a. Також, за дії посухи, збільшується рівень стаціонарної флуоресценції - F_{st}. Підвищення рівня F_{st} виявляє порушення у темній фазі фотосинтезу.

У таблиці 2 представлені розрахунки показників індукції флуоресценції хлорофілу різних сортів озимої пшениці на 1-й день посухи. Показник квантової ефективності фотосистеми II (F_v/F_{max}) є досить стійким параметром. Його значне зниження, зазвичай, спостерігається лише за дії досить сильних стресорів, таких, наприклад, як температура вища за 45°C. На 1-й день дії посухи у досліджуваних сортів спостерігається незначне зниження цього показника. Найбільше

зниження спостерігається для сорту Наталка. Також спостерігається зменшення показника F_{max}/F_{st}, який носить назву "Index vitality" та може характеризувати загальну роботу фотосинтетичного апарату. Для всіх сортів збільшується показник Q_b-невідновлюючі/Q_b-відновлюючі реакційні центри. За дії посухи збільшується кількість Q_b-невідновлюючих центрів та зменшується кількість Q_b-відновлюючих. Особливо сильні зміни цього показника відмічаються у сортів Наталка та Порадниця.

Час досягнення максимального значення флуоресценції (Час max) є важливим показником використання сонячної енергії для збудження електронів на реакційному центрі ФСII. Як відомо, максимальний рівень флуоресценції досягається в тому стані, коли переносник електронів хінонової природи Q_a знаходиться у максимально відновленому стані. Швидкість цього процесу залежить від

Таблиця 2. Показники індукції флуоресценції хлорофілу різних сортів озимої пшениці на 1-й день посухи.

Сорт	F _v /F _{max}	F _{max} /F _{st}	Q _b -невідновлюючі /Q _b -відновлюючі	Час max, с
Наталка, контроль	0,73±0,01	2,89±0,01	1,09±0,05	0,47±0,01
Наталка, посуха	0,68±0,02	2,88±0,03	1,42±0,07	0,64±0,01
Подільська нива, контроль	0,74±0,02	3,05±0,04	0,49±0,03	0,52±0,01
Подільська нива, посуха	0,71±0,01	2,76±0,03	0,56±0,03	0,61±0,01
Подольянка, контроль	0,72±0,01	3,04±0,03	0,84±0,04	0,53±0,01
Подольянка, посуха	0,71±0,01	2,73±0,04	0,74±0,03	0,71±0,01
Порадниця, контроль	0,72±0,01	2,90±0,02	0,77±0,01	0,58±0,01
Порадниця, посуха	0,72±0,01	2,63±0,02	1,29±0,04	0,62±0,01

притоку електронів від реакційного центру та відтоку електронів на акцептор Q_b. У випадку, коли

транспорт електронів погіршується, при значному переносі квантів енергії на реакційний центр, хлорофіл реакційних центрів може переходити у триплетний стан і ініціювати виділення активних форм кисню. Тому зменшення ефективності переносу енергії, або розмірів світлозбиральної антени, можна вважати захисним механізмом фотосинтетичного апарату від

продукування активних форм кисню. Як можна бачити з таблиці 2 максимальне збільшення часу досягнення максимуму спостерігається для сорту Подолянка та Наталка, а дещо менше для Порадниці та Подільської ниви.

В таблиці 3 представлені показники кривих індукції флуоресценції на 7-й день посухи.

Таблиця 3. Параметри кривої індукції флуоресценції хлорофілу на 7-й день посухи.

Сорт	F ₀ , ум.од.	F _{pl} , ум.од.	F _{max} , ум.од.	F _{st} , ум.од.
Наталка, контроль	803±3	1172±12	1532±18	837±3
Наталка, посуха	791±2	1145±10	1427±12	803±3
Подільська нива, контроль	738±2	990±10	1325±15	759±3
Подільська нива, посуха	711±2	968±10	1279±15	736±6
Подолянка, контроль	732±3	963±10	1290±17	761±8
Подолянка, посуха	751±5	1083±12	1374±14	812±7
Порадниця, контроль	822±5	1256±11	1581±12	831±5
Порадниця, посуха	805±4	1215±11	1506±9	833±5

З таблиці 3 видно, що на 7-й день дії посухи рівень F₀ знизився, у всіх сортів крім Подолянки, що говорить про зменшення кількості неактивних центрів. Рівень F_{max} дещо підвищився. А рівень F_{st}, за дії посухи, також зменшився. Таким чином можна говорити про часткове відновлення показників фотосинтетичного апарату на 7-й день посухи.

Показник квантової ефективності фотосистеми II (F_v/F_{max}) на 7-й день дії посухи відновився у всіх сортів крім сорту Наталка (таб. 4). Також спостерігалось зменшення різниці між контролем та посухою для показника F_{max}/F_{st}. Для всіх сортів зберігається різниця показника Q_б-невідновлюючі/Q_б-відновлюючі реакційні центри. За дії 7-ми денної посухи кількість Q_б-невідновлюючих центрів залишається підвищеною, а кількість Q_б-відновлюючих центрів зниженою. Час досягнення максимального значення флуоресценції також залишається збільшеним, але не в такій мірі як на 1-й день посухи. Таким чином, з отриманих даних видно, що до 7-го дня помірної посухи у більшості сортів відбувається формування неспецифічної

стійкості фотосинтетичного апарату до водного дефіциту. Виключення складає сильний, вискобілковий сорт Наталка, де відновлення індукційної кривої майже не відбувається.

Для з'ясування причин формування неспецифічної стійкості було проведено дослідження змін вмісту протеїнів, які визначені як протеїни-протектори, які за дії несприятливих абіотичних факторів можуть виконувати стабілізуючу роль для деяких ланок фотосинтетичного апарату в хлоропластах. Це білки з молекулярною масою 36, 21, 16 та 14 кДа. Білок 36 кДа - так звана пластохінолоксидаза, який є альтернативним акцептором електронів для переведеного пулу пластохінонів, який у критичних випадках відбирає на себе частину електронів та дозволяє зберегти електронний транспорт через фотосистему II на високому рівні, що запобігає утворенню активних форм кисню. 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

Таблиця 4. Показники індукції флуоресценції хлорофілу різних сортів озимої пшениці на 7-й день посухи.

Сорт	F _v /F _{max}	F _{max} /F _{st}	Q _б -невідновлюючі / Q _б -відновлюючі	Час max, с
Наталка, контроль	0,69±0,01	2,92±0,01	1,03±0,03	0,46±0,01
Наталка, посуха	0,67±0,01	2,90±0,01	1,26±0,03	0,66±0,01
Подільська нива, контроль	0,69±0,01	2,99±0,02	0,75±0,01	0,48±0,01
Подільська нива, посуха	0,71±0,01	3,08±0,01	0,83±0,01	0,68±0,01
Подолянка, контроль	0,68±0,01	2,85±0,01	0,71±0,01	0,54±0,01
Подолянка, посуха	0,69±0,01	2,67±0,02	1,14±0,04	0,66±0,01
Порадниця, контроль	0,69±0,01	3,11±0,01	1,34±0,01	0,41±0,01
Порадниця, посуха	0,68±0,01	2,88±0,01	1,41±0,03	0,57±0,01

щільного зв'язування Ca⁺⁺ та Cl⁻. В таблиці 5 представлені розрахунки вмісту цих протеїнів в зразках сортів рослин озимої пшениці на 7-й день посухи (таб. 5). У посухостійких сортів спостерігали більш

високий вміст досліджених низькомолекулярних протеїнів з молекулярною масою 36, 21, 16 та 14 кДа, у менш стійких цей показник був нижчим.

Таблиця 5. Відносний вміст протеїнів в хлоропластах листків рослин озимої пшениці після посухи. (середній % від загального білку хлоропластів).

Сорт	Подолянка		Наталка		Подільська нива		Порадниця	
	контроль	посуха	контроль	посуха	контроль	посуха	контроль	посуха
36 кДа	4,8±0,1	7,2±0,2	4,7±0,1	5,2±0,1	5,0±0,1	5,8±0,1	4,8±0,1	5,9±0,1
21 кДа	4,2±0,1	6,2±0,1	4,9±0,1	5,2±0,1	4,9±0,1	5,6±0,1	3,6±0,1	5,0±0,1
16 кДа	5,0±0,1	8,5±0,2	5,6±0,2	6,2±0,1	6,4±0,1	7,1±0,2	4,9±0,1	7,6±0,2
14 кДа	4,7±0,1	6,7±0,1	5,0±0,1	6,0±0,1	5,6±0,1	6,8±0,1	4,8±0,1	6,5±0,2

З таблиці 5 видно, що найбільш активно синтез протекторних низькомолекулярних протеїнів проходив в рослинах сорту Подолянка та Подільська нива, а також, дещо менше, в сорту Порадниця. В хлоропластах листків рослин озимої пшениці сильного, високобілкового сорту Наталка збільшення вмісту цих протеїнів відбувалось в меншій мірі.

За недостатнього вологозабезпечення в першу чергу знижується фотосинтетична активність в листках зелених рослин. Відомі процеси деградації основних протеїнів комплексу реакційних центрів D1/D2/cytb 559 за дії посухи та високих температур [6]. При таких ситуаціях основна робота рослинного організму спрямовується на зниження втрат вологи, на підвищення роботи антиоксидантних систем та «включення» систем захисту: синтез протеїнів, які підвищують статус та стан основних структур в хлоропластах та в

клітині в цілому. Таким чином показано, що відновлення показників індукції флуоресценції на 7-й день посухи може бути пов'язане із підвищеним синтезом низькомолекулярних захисних протеїнів фотосинтетичного апарату, що збігається з отриманими раніше даними [6].

Висновки. У цінних сортів озимої пшениці Подолянка, Порадниця та Подільська нива за дії помірної посухи формується неспецифічна стійкість фотосинтетичного апарату за рахунок підвищеного синтезу захисних низькомолекулярних протеїнів. Сильний, високобілковий сорт Наталка лише частково відновлює показники фотосинтетичної активності та вирізняється незначним збільшенням вмісту захисних протеїнів фотосинтетичного апарату за дії 7-ми денної посухи.

ЛІТЕРАТУРА

1. Lesk C., Rowhani P., Ramankutty N. Influence of extreme weather disasters on global crop production // Nature, 2016. 529(7584). P. 84-87.
2. 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 2021. DOI: [10.5772/intechopen.92378](https://doi.org/10.5772/intechopen.92378) In book: Plant Stress Physiology.
3. Киризий 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.
4. Креславский В.Д. Карпентьер Р., Климов В.В., Мурата Н., Аллахвердиев С.И. Молекулярные механизмы устойчивости фотосинтетического аппарата к стрессу // Биологические мембраны. 2007. Т. 3. С. 195-217.
5. Morgun V.V., Stasik O.O., Kirizy D.A., Sokolovska-Sergienko O.G. Effect of drought on photosynthetic apparatus, activity of antioxidant enzymes, and productivity of modern winter wheat varieties // Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2019. V.10. P. 16-25.
6. Бондаренко О.Ю., Шевченко В.В. Зміни вмісту пігментів та структурних протеїнів мембран хлоропластів у різних сортів озимої пшениці за дії посухи // Science and Education a New Dimension – 2021. IX, № 32. С. 7-10.
7. Кедрук А.С., Кіризі Д.А. Соколовська-Сергієнко О.Г., Стасик О.О. Реакція фотосинтетичного апарату сортів озимої пшениці на комбіновану дію посухи та високої температури // Фізіологія рослин і генетика. 2021. Т. 53. С. 387–405.
8. Senapati N., Stratonovitch P., Paul M.J., Semenov M.A. Drought tolerance during reproductive development is important for increasing wheat yield potential under climate change in Europe // J. Exp. Bot. 2019. V. 70, No. 9. P. 2549-2560.

REFERENCES

1. Lesk C., Rowhani P., Ramankutty N. Influence of extreme weather disasters on global crop production // Nature, 2016. 529(7584). P. 84-87.
2. 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 2021. DOI: [10.5772/intechopen.92378](https://doi.org/10.5772/intechopen.92378) In book: Plant Stress Physiology.
3. 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.
4. 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.
5. Morgun V.V., Stasik O.O., Kirizy D.A., Sokolovska-Sergienko O.G. Effect of drought on photosynthetic apparatus, activity of antioxidant enzymes, and productivity of modern winter wheat varieties // Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2019. V.10. P. 16-25.
6. Bondarenko O.Yu., Shevchenko V.V. Changes in the content of pigments and structural proteins of chloroplast membranes in different varieties of winter wheat under the influence of drought // Science and Education a New Dimension. 2021. IX, № 32. P. 7-10.
7. Kedruk A.C., Kirizy D.A., Sokolovska-Sergienko O.G., Stasik O.O. Response of the photosynthetic apparatus of winter wheat varieties to the combined action of drought and high temperature // Plant Physiology and genetics. 2021. V. 53. P. 387–405.
8. Senapati N., Stratonovitch P., Paul M.J., Semenov M.A. Drought tolerance during reproductive development is important for increasing wheat yield potential under climate change in Europe // J. Exp. Bot. 2019. V. 70, No. 9. P. 2549-2560.

Changes in the parameters of chlorophyll fluorescence induction and content of low molecular weight protective proteins in modern varieties of winter wheat under drought

V. V. Shevchenko, O. Yu. Bondarenko

Abstract. Changes in the induction of chlorophyll fluorescence and the content of low molecular weight protective proteins in four varieties of winter wheat under drought were studied. It is shown that on the seventh day of moderate drought valuable varieties Podolyanka, Poradnytsia and Podil's'ka nyva form non-specific resistance due to increased synthesis of protective proteins. The strong, high-protein variety Natalka only partially restored fluorescence induction and had a slight increase in the content of protective proteins of the photosynthetic apparatus.

Keywords: *Triticum aestivum* L., winter wheat, induction of chlorophyll fluorescence, low molecular weight protective proteins of the photosynthetic apparatus, drought.