

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.1

РЕАКЦИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ЛИСТА ОГУРЦА НА КРАТКОВРЕМЕННОЕ ЕЖЕСУТОЧНОЕ ПОНИЖЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ

© 2015 г. Е. Н. Икконен, Т. Г. Шибаева, А. Ф. Титов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск

Поступила в редакцию 21.10.2014 г.

Изучали влияние кратковременного (2 ч в конце ночного периода) ежесуточного понижения температуры до 12°C (ДРОП-воздействие) на реакции фотосинтетического аппарата листьев огурца (*Cucumis sativus* L.), находящихся в период воздействия в фазе активного роста (ДРОП_I) или в зрелом состоянии (ДРОП_{II}). ДРОП-воздействие индуцировало адаптационные изменения в фотосинтетическом аппарате, проявившиеся в повышении уровня фотосинтеза при низких температурах, а также изменения пигментного состава, содержания воды в листьях и отношения сухой массы листьев к их площади. Фаза развития листа оказывала значительное влияние на реакцию фотосинтетического аппарата на ДРОП. Показано, что листья, подвергшиеся ДРОП в фазе активного роста, были способны к большим структурным преобразованиям, что обусловило и более значимое повышение устойчивости фотосинтеза к низкой температуре, в то время как листья, находившиеся во время ДРОП-воздействия в зрелом состоянии, характеризовались меньшими адаптационными возможностями.

Ключевые слова: *Cucumis sativus* — кратковременное понижение температуры — фаза развития листа — устойчивость фотосинтеза — пигменты

DOI: 10.7868/S0015330315040090

ВВЕДЕНИЕ

Фотосинтез является одним из наиболее чувствительных к холоду физиологических процессов, поэтому адаптация растений к низким температурам тесно связана с адаптацией фотосинтетического аппарата, которая проявляется, в частности, в повышении устойчивости фотосинтеза к снижению температуры [1]. Растения, адаптированные к холоду, как правило, сохраняют или даже повышают скорость фотосинтеза в условиях пониженной температуры [2] со смещением температурного оптимума этого процесса в область более низких значений [3]. Теплолюбивые виды, такие как огурец, характеризуются по сравнению с холодостойкими растениями гораздо более низкой способностью к адаптации [4, 5] и проявляют повышенную чувствительность фотосинтетического аппарата к холоду [6]. Тем не менее, как показали наши исследования, при

ежесуточных кратковременных понижениях температуры (в ночной период) до закалывающих значений (ДРОП-воздействие, от англ. drop — падение) у растений огурца наблюдается существенное повышение уровня холодостойкости [7] и изменение реакций устьичного аппарата [8]. Поскольку структурно-функциональные изменения в фотосинтетическом аппарате растений происходят очень быстро, даже после их часовой экспозиции на холоде [9], а низкотемпературная чувствительность фотосинтеза может меняться в минутном интервале [10], мы предположили, что кратковременные ежесуточные понижения температуры способны вызывать значительные изменения в функционировании фотосинтетического аппарата теплолюбивых растений.

Известно, что степень сформированности (зрелости) листа заметно влияет на его способность адаптироваться к условиям окружающей среды, включая температуру. В ряде работ [12, 13] показано, что в листьях, формирование которых проходило в условиях низких температур, адаптационные изменения в фотосинтетическом аппарате проявлялись в большей степени, чем в листьях, испытавших воздействие холодом в зрелом состоянии. Более низкая способность к температурной адаптации фотосинтеза у листьев, закон-

Сокращения: ДРОП — кратковременное ежесуточное понижение температуры (от англ. drop); ДРОП_I — ДРОП-воздействие на лист, находящийся в фазе активного роста; ДРОП_{II} — ДРОП-воздействие на зрелый лист; Хл — хлорофилл; Кар — каротиноиды; LMA — отношение сухой массы листьев к их площади.

Адрес для корреспонденции: Икконен Елена Николаевна. 185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11. Институт биологии КарНЦ РАН, электронная почта: likkonen@gmail.com

чивших рост, может быть связана с меньшими, чем у активно растущих листьев, возможностями структурной перестройки в условиях низкой температуры [14]. Таким образом, цель настоящей работы заключалась в исследовании реакции фотосинтетического аппарата на кратковременные ежесуточные понижения температуры у листьев огурца, подвергнутых данному воздействию в период их активного роста (созревания) или уже завершивших рост (зрелых).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растения огурца (*Cucumis sativus* L., гибрид Зозуля) выращивали в камере искусственного климата ("Vötsch", Германия) при поливе полным питательным раствором (рН 6.2–6.4), температуре воздуха 23°C, фотосинтетически активной радиации (ФАР) 150 мкмоль/(м² с), фотопериоде 12 ч, влажности воздуха 60–70%. Первая группа растений в течение 6 суток ежедневно подвергалась 2-часовому воздействию температуры 12°C в конце ночного периода (ДРОП-воздействие) в период активного роста второго листа (от окончания лаг-фазы до достижения 60–70% от площади закончившего рост листа, 12–17-е сутки после замачивания семян, ДРОП_I). После окончания цикла ДРОП-воздействий растения варианта ДРОП_I продолжали выращивать в оптимальных температурных условиях (23°C) до полной зрелости второго листа (24-е сутки после замачивания семян). Другая группа растений испытывала ДРОП-воздействия в течение 6 суток, когда второй лист находился в зрелом состоянии (в фазе снижения скорости роста и достижения листом окончательной площади, 19–24-е сутки после замачивания семян, ДРОП_{II}). Третья группа растений, которую выращивали при температуре 23°C и без ДРОП-воздействий, была принята за контроль.

Для оценки реакции фотосинтетического аппарата растений на краткосрочные изменения температуры скорость видимого фотосинтеза листьев измеряли на втором, достигшем зрелости листе при температуре листа 12, 23 и 38°C и ФАР, равной 150 и 1200 мкмоль/(м² с) с помощью портативной фотосинтетической системы HSCM-1000 ("Walz", Германия). Продолжительность экспозиции растений при данных температурах измерения составляла 15–25 мин в зависимости от времени, необходимого для стабилизации процесса фотосинтеза.

В конце эксперимента определяли площадь листьев и сухую биомассу растений. Рассчитывали отношение сухой массы листьев к их площади (LMA, от leaf mass per area). Для исследования содержания фотосинтетических пигментов брали пробы из 2-го листа. Содержание хлорофилла (Хл) *a* и *b* и каротиноидов (Кар) определяли с помощью спектрофотометра СФ-2000 ("Спектр",

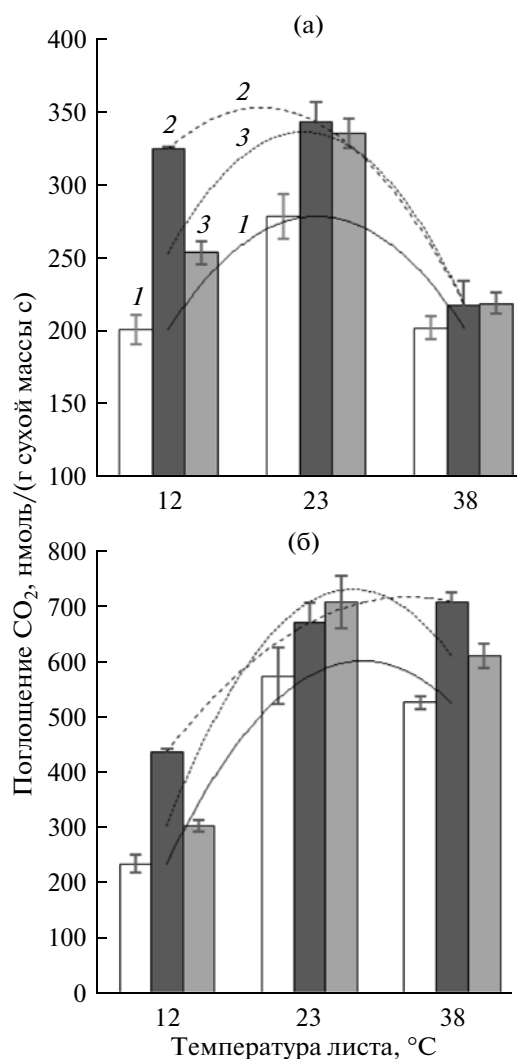
Россия), экстрагируя их 96% этиловым спиртом, и рассчитывали по известным формулам [15]. Долю хлорофиллов ССК устанавливали, исходя из того, что весь Хл *b* находится в ССК, а соотношение Хл *a/b* при этом составляет 1.2 [16]. Для определения оводненности листьев их взвешивали до и после высушивания при 105°C до постоянного веса. Процент оводненности рассчитывали на сырой вес листьев. Все измерения были выполнены на 24-й день после замачивания семян на втором, закончившем рост листе.

Результаты представлены в виде средних значений по двум независимым опытам (4 и более повторности в каждом опыте) и их стандартных ошибок. Достоверность различий между средними определена на основе дисперсионного анализа с использованием программного обеспечения Statistica (v. 8.0.550.0, "StatSoft, Inc."). В статье обсуждаются величины, достоверно различающиеся при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Температурная зависимость видимого фотосинтеза листьев огурца заметно различалась в зависимости от того, испытывали или не испытывали растения воздействие холода (рисунок). Кроме того, характер температурной зависимости фотосинтеза изменялся в зависимости от уровня освещенности, особенно в варианте ДРОП_I. Кривая, аппроксимирующая температурную зависимость фотосинтеза листьев ДРОП_I при уровне света ниже насыщающего фотосинтез (150 мкмоль/(м² с) ФАР), наглядно демонстрирует смещение температурного оптимума фотосинтеза в сторону более низких температур относительно контроля и варианта ДРОП_{II} (рис. а). Однако при насыщающем свете (1200 мкмоль/(м² с) ФАР) температура оптимума фотосинтеза в листьях в варианте ДРОП_I смещалась в область более высоких температур (рис. б).

При оптимальной температуре измерения (23°C) скорость фотосинтеза в листьях вариантов ДРОП_I и ДРОП_{II} была выше (на 23 и 20% соответственно), чем в контроле только при низком уровне освещения. В условиях низкой температуры измерения (12°C) скорость фотосинтеза была самой высокой в листьях варианта ДРОП_I, превышая контрольные значения, соответственно, на 61 и 86% при 150 и 1200 мкмоль/(м² с) ФАР. При 12°C в листьях варианта ДРОП_{II} скорость фотосинтеза также поддерживалась на уровне, превосходящем контроль, но была ниже, чем в листьях, подвергнутых ДРОП_I при слабом и интенсивном освещении, на 20 и 30% соответственно. При температуре измерения 38°C скорость фотосинтеза в трех исследованных вариантах достоверно не различалась при низком освещении, но при насыщающем свете у листьев в варианте



Видимый фотосинтез при 150 (а) и 1200 (б) мкмоль/(м² с) ФАР в листьях огурца, не испытывавших (контроль) и испытывавших кратковременное ежесуточное понижение температуры в фазе активного роста (ДРОП_I) и в зрелом состоянии (ДРОП_{II}).

1 – контроль; 2 – ДРОП_I; 3 – ДРОП_{II}.

ДРОП_I она была на 35 и 16% выше, чем в контроле и в варианте ДРОП_{II} соответственно.

Действие ДРОП на зрелые листья (ДРОП_{II}) не оказало влияния на накопление биомассы и площадь листьев растений, тогда как листья, подвергавшиеся действию ДРОП во время активного роста (ДРОП_I), имели тенденцию к снижению сухого веса растений и площади листьев (таблица). Однако статистически эти различия не подтверждены, что, по-видимому, связано с небольшой продолжительностью действия ДРОП. Значения LMA в вариантах ДРОП_I и ДРОП_{II} достоверно уменьшились по отношению к контролю на 20 и 17% соответственно.

У растений в варианте ДРОП_I содержание Хл *a* и *b* в листьях было ниже, чем у контрольных растений, и отмечали увеличение соотношения Хл *a/b*. У растений в варианте ДРОП_{II} произошло снижение содержания только Хл *b*, что также привело к увеличению соотношения Хл *a/b*. Доля хлорофиллов, принадлежащих ССК, снизилась по отношению к контролю в обоих вариантах с ДРОП. Не выявлено достоверных различий между тремя вариантами опыта по содержанию Кар в листьях, но в связи с уменьшением содержания Хл в листьях соотношение Кар/Хл увеличилось в обоих вариантах с ДРОП.

Оводненность тканей листа у растений в варианте ДРОП_{II} не изменилась по сравнению с контролем, а у растений в варианте ДРОП_I наблюдалось небольшое, но достоверное уменьшение этого показателя (таблица).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований показали, что после серии ежесуточных кратковременных понижений температуры до закалывающей величины (12°C) растения огурца не только сохранили фотосинтетическую активность, но даже повысили устойчивость фотосинтеза к низкой температуре, выявив наличие адаптационных изменений в фотосинтетическом аппарате. Такое повышение было более выраженным у листьев, подвергшихся действию ДРОП в период их активного роста и созревания. Под влиянием ДРОП происходило изменение величины LMA, содержания и соотношения пигментов и оводненности листьев, что может свидетельствовать о структурных и функциональных перестройках в листьях огурца, которые неизбежны при адаптации растений к холоду.

Рост растений в условиях пониженных температур, как правило, способствует утолщению листа и, соответственно, увеличению LMA [17]. Однако в наших экспериментах под влиянием ДРОП значения LMA уменьшились, причем независимо от того, в какой фазе развития находились листья. Считается, что у растений с низким LMA (при более тонком листе) фотосинтез эффективнее из-за снижения затрат на формирование листа и потерь световой энергии. При этом уменьшение величины LMA может отражать повышение доли фотосинтетически активных тканей по отношению к объему клеточных стенок в сухой массе листьев [18]. Существует также мнение, что при снижении плотности листа увеличивается проводимость для CO₂ к стромам хлоропластов, способствуя протеканию фотосинтеза [19]. Следовательно, можно предположить, что структурные изменения, проявившиеся в уменьшении величины LMA, сопровождались повышением фотосинтетической активности листьев, испытывавших воздействия ДРОП.

Влияние ДРОП на некоторые физиолого-биохимические показатели листьев огурца, не испытывавших (контроль) и испытывавших кратковременное ежесуточное понижение температуры в фазе активного роста (ДРОП_I) и в зрелом состоянии (ДРОП_{II})

Параметры	Контроль	ДРОП _I	ДРОП _{II}
DM, г	1.18 ± 0.07 ^a	1.07 ± 0.09 ^a	1.22 ± 0.11 ^a
LA, см ²	514.2 ± 20.5 ^a	483.6 ± 41.8 ^a	496.3 ± 60.2 ^a
LMA	1.81 ± 0.08 ^a	1.44 ± 0.05 ^b	1.50 ± 0.03 ^b
Хл <i>a</i> , мг/г сухой массы	16.3 ± 0.2 ^a	15.1 ± 0.3 ^b	16.0 ± 0.5 ^a
Хл <i>b</i> , мг/г сухой массы	7.6 ± 0.2 ^a	6.3 ± 0.2 ^b	6.5 ± 0.2 ^b
Хл (<i>a</i> + <i>b</i>), мг/г сухой массы	23.9 ± 0.3 ^a	21.4 ± 0.5 ^b	22.5 ± 0.6 ^a
Хл <i>a/b</i>	2.21 ± 0.06 ^b	2.38 ± 0.02 ^a	2.45 ± 0.06 ^a
Хл ССК, %	69.7 ± 1.5 ^a	65.1 ± 0.8 ^b	64.9 ± 1.2 ^b
Кар, мг/г сухой массы	2.76 ± 0.10 ^a	2.83 ± 0.02 ^a	2.80 ± 0.06 ^a
Кар/Хл	0.114 ± 0.003 ^b	0.131 ± 0.004 ^a	0.120 ± 0.002 ^b
W, %	88.9 ± 0.1 ^a	87.9 ± 0.0 ^b	88.5 ± 0.0 ^a

Примечание. Приведены данные по сухой массе растений (DM), площади листьев (LA), отношению сухой массы листьев к их площади (LMA), содержанию хлорофиллов (Хл *a* и *b*), доле хлорофиллов ССК (Хл ССК), содержанию каротиноидов (Кар) и оводненности (W). В пределах каждого параметра различные буквы указывают на достоверность различий средних значений при уровне значимости $P < 0.05$.

В листьях, подвергшихся действию ДРОП в период активного роста, содержание пигментов снизилось в большей степени, чем в листьях, испытывавших подобное воздействие в зрелом состоянии. Отношение Хл *a/b* повысилось, а доля пигментов в ССК понизилась независимо от того, на какой стадии развития находился лист во время низкотемпературных воздействий. Повышение доли Хл *a* по отношению к Хл *b* и уменьшение пула ССК можно рассматривать как адаптивную реакцию, позволяющую избежать фотоингибирования путем снижения количества поглощаемого света [20] и способствующую сохранению согласованности между световой и темновой фазами фотосинтеза при пониженных температурах.

Культурные растения, произрастающие в условиях Севера, обычно реагируют на понижение температуры уменьшением пула ССК и увеличением доли Хл, принадлежащего фотосистемам [21]. Такая лабильность пигментной системы может обеспечивать более широкий температурный диапазон работы фотосинтеза. В наших экспериментах ДРОП-воздействия не повлияли на содержание каротиноидов, выполняющих важную светозащитную и светособирающую роль в фотосинтетическом аппарате, однако у растений в варианте ДРОП_I за счет снижения содержания Хл повысилась доля Кар в расчете на единицу Хл, что усилило защиту зеленых пигментов от окисления. Таким образом, в листьях, испытывавших ДРОП-воздействия в разном возрастном состоянии, произошли адаптационные перестройки на уровне фотосинтетических пигментов, но в большей степени они проявились в листьях, находившихся в период этих воздействий в состоянии созревания и активного роста. Поэтому выявленное нами повышение устойчивости фотосинтеза листьев огурца, особенно в варианте ДРОП_I, к по-

ниженным температурам могло быть обусловлено в том числе и количественными изменениями в пигментном составе, индуцированными ДРОП.

Снижение содержания воды в листьях огурца, испытывавших ДРОП-воздействия в фазе активного роста, возможно, связано с увеличением объема цитоплазмы относительно объема вакуоли. Такие анатомические изменения могли привести к повышению содержания неорганического фосфата в цитоплазме. Известно, что при кратковременном снижении температуры одним из основных лимитирующих фотосинтез факторов является доступность неорганического фосфата [22]. Вполне вероятно, что значительный рост интенсивности фотосинтеза в листьях растений в варианте ДРОП_I в условиях низкой температуры был связан хотя бы отчасти с повышением содержания неорганического фосфата в цитозоле и хлоропластах благодаря увеличению объема цитоплазмы и дополнительному высвобождению неорганического фосфата в цитоплазму из вакуоли, что рассматривается как быстрый путь восстановления фотосинтетической активности при адаптации растений к холоду [22].

Таким образом, кратковременное ежесуточное понижение температуры до субоптимальных (закаливающих) значений вызывало повышение скорости фотосинтеза у растений огурца, которое сопровождалось структурными изменениями фотосинтетического аппарата, включая изменения содержания и соотношения в листе фотосинтетических пигментов и их распределения по фотосинтетическим пулам. В большей степени повышение устойчивости фотосинтеза растений к снижению температуры проявилось в листьях, подвергшихся ДРОП в фазе активного роста. Адаптация листьев, испытывающих действие

низкой температуры во время их активного роста и созревания, включает перестройки на уровне самих листьев, о чем свидетельствовали изменения LMA, состава и соотношения фотосинтетических пигментов, оводненности тканей листа. Очевидно, что листья, подвергшиеся действию холода в зрелом состоянии, не способны изменить свою структуру, химический состав и ферментативную активность в той степени, которая необходима для более полной адаптации [23]. Адаптация у них происходит за счет изменения работы уже существующих (сформированных) клеточных структур и систем, безусловно, ограничивая их адаптивные возможности, что и показано в настоящей работе.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 14-04-00840_а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Климов С.В., Бураханова Е.А., Алиева Г.П., Суворова Т.А. Способность растений озимой пшеницы закаливаться к морозу связана с особенностями CO₂-газообмена, синтезом биомассы и различных форм водорастворимых углеводов // Изв. АН. Сер. биол. 2010. № 2. С. 210–216.
2. Головки Т.К., Далькэ И.В., Бачаров Д.С. Мезоструктура и активность фотосинтетического аппарата трех видов растений сем. Crassulaceae в холодном климате // Физиология растений. 2008. Т. 55. С. 671–680.
3. Way D.A., Yamori W. Thermal acclimation of photosynthesis: on the importance of adjusting our definitions and accounting for thermal acclimation of respiration // Photosynth. Res. 2014. V. 119. P. 89–100.
4. Тимов А.Ф. Устойчивость активно вегетирующих растений к низким и высоким температурам: закономерности варьирования и механизмы: Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. Москва: ИФР РАН, 1989. 42 с.
5. Yamori W., Noguchi K., Hikosaka K., Terashima I. Phenotypic plasticity in photosynthetic temperature acclimation among crop species with different cold tolerances // Plant Physiol. 2010. V. 152. P. 388–399.
6. Климов С.В., Попов В.Н., Дубинина И.М., Бураханова Е.А., Трунова Т.И. Пониженная холодостойкость теплолюбивых растений связана с ингибированием ассимиляции CO₂ в листьях и накопления сахаров в корнях // Физиология растений. 2002. Т. 49. С. 871–877.
7. Марковская Е.Ф., Сыроева М.И., Харьковская Т.Г., Шерудило Е.Г. Влияние кратковременного снижения ночной температуры на рост и холодостойкость растений огурца // Физиология растений. 2000. Т. 47. С. 511–515.
8. Икконен Е.Н., Шибалева Т.Г., Сыроева М.И., Шерудило Е.Г. Устьичная проводимость *Cucumis sativus* L. при длительном и кратковременном действии низких температур // Физиология растений. 2012. Т. 59. С. 716–720.
9. Венжик Ю.В., Тимов А.Ф., Таланова В.В., Мирославов Е.А., Котеева Н.К. Структурно-функциональная реорганизация фотосинтетического аппарата растений пшеницы при холодовой адаптации // Цитология. 2012. Т. 54. С. 916–924.
10. Климов С.В. Морозостойкость растений озимой пшеницы зависит от адаптации фотосинтеза и дыхания в разных временных интервалах // Изв. АН. Сер. биол. 2009. № 3. С. 313–322.
11. Воронин П.Ю., Рахманкулова З.Ф., Маевская С.Н., Николаева М.К., Шуйская Е.В. Изменение фотосинтеза в результате адаптации проростков кукурузы к кратковременной засухе // Физиология растений. 2014. Т. 61. С. 143–147.
12. Campbell C., Atkinson L., Zaragoza-Castells J., Lundmark M., Atkin O., Hurry V. Acclimation of photosynthesis and respiration is asynchronous in response to changes in temperature regardless of plant functional group // New Phytol. 2007. V. 176. P. 375–389.
13. Gorsuch P.A., Pandey S., Atkin O.K. Temporal heterogeneity of cold acclimation phenotypes in *Arabidopsis* leaves // Plant Cell Environ. 2010. V. 33. P. 244–258.
14. Ow L.F., Griffin K.L., Whitehead D., Walcroft A.S., Turnbull M.H. Thermal acclimation of leaf respiration but not photosynthesis in *Populus deltoids* × *nigra* // New Phytol. 2008. V. 178. P. 123–134.
15. Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents // Biochem. Soc. Trans. 1983. V. 603. P. 591–592.
16. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // Methods Enzymol. 1987. V. 148. P. 350–382.
17. Кислюк И.М., Васильковский М.Д., Буболо Л.С., Палеева Т.В. Влияние температуры на строение листьев и фотосинтез *Carex lugens* (Cyperaceae) и *Arctagrostis arundinacea* (Poaceae) // Ботан. журн. 1983. Т. 68. С. 1325–1332.
18. Васфилов С.П. Анализ причин изменчивости отношения сухой массы листа к его площади у растений // Журн. общ. биол. 2011. Т. 72. С. 436–454.
19. Poorter H., Niinemets U., Poorter L., Wright I.J., Villar R. Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis // New Phytol. 2009. V. 182. P. 565–588.
20. Дымова О.В., Гриб И., Головки Т.К., Стржалка К. Состояние пигментного аппарата зимне- и летне-зеленых листьев теневыносливого растения *Ajuga reptans* // Физиология растений. 2010. Т. 57. С. 809–818.
21. Головки Т.К., Куренкова С.В., Табаленкова Г.Н. Фитофизиологические исследования на Севере. Сыктывкар: Институт биологии КомиНЦ УрО РАН, 2002. 83 с.
22. Sage R.F., Kubien D.S. The temperature response of C₃ and C₄ photosynthesis // Plant Cell Environ. 2007. V. 30. P. 1086–1106.
23. Loveys B.R., Atkinson L.J., Sherlock D.J., Roberts R.L., Fitter A.N., Atkin O.K. Thermal acclimation of leaf and root respiration: an investigation comparing inherently fast- and slow-growing plant species // Global Change Biol. 2003. V. 9. P. 895–910.