

Сариева Гульмира Едигеевна

**АДАПТАЦИОННЫЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ
У ПШЕНИЦЫ С ПРИЗНАКОМ «СВЁРНУТЫЙ ЛИСТ» ПРИ ЗАСУХЕ**

03.00.12 – физиология и биохимия растений

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Алматы, 2004

Работа выполнена в Институте физиологии, генетики и биоинженерии растений Министерства образования и науки Республики Казахстан

Научный руководитель доктор биологических наук
С.С. Кенжебаева

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Б.А. Сарсенбаев

кандидат биологических наук, доцент
Р.А. Алыбаева

Ведущая организация: Институт физиологии растений
им К.Н. Тимирязева
Российской Академии Наук

Защита состоится 3 сентября 2004 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 53.50.01 в Институте физиологии, генетики и биоинженерии растений по адресу: 480090, г. Алматы, ул. Тимирязева, 45.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии, генетики и биоинженерии растений.

Автореферат разослан « » июля 2004 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Д.Ш. Ахметова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Засуха является весьма опасным стрессовым фактором, лимитирующим продуктивность пшеницы в Казахстане (Полиμβетова, 1986, 1999). В связи с этим исследование устойчивости пшеницы к засухе является особенно актуальной проблемой (Полиμβетова, 1972; Сарсенбаев, 1988; Мамонов и др., 1999). Генетико-морфологические механизмы засухоустойчивости растений подразделяют, согласно J. Levitt (1980), на механизмы «избегания» засухи (раннее цветение, короткий вегетационный период), «уклонения» от засухи (снижение транспирационной поверхности, более развитая корневая система) и собственно устойчивость к засухе (осмотическое регулирование).

В настоящее время селекция пшеницы, в основном, направлена на создание новых форм и генотипов с введёнными адаптивными морфофизиологическими признаками, обеспечивающими уклонение от засухи (Blum, 1998; Богданова и др., 1999; Уразалиев, 2000). Среди этих признаков изменение морфологии листа - свёртывание листовой пластинки уменьшает площадь абсорбции света и способствует более эффективному использованию воды растением (Price et al., 1997). Признак свёртывания листа с целью повышения засухоустойчивости использовался в селекции риса (Hsiao et al., 1984; Dingkuhn et al., 1989), кукурузы (Premachandra et al., 1992), сорго (Corlett et al., 1994) и пшеницы (Богданова и др., 1995). Однако физиолого-биохимическая роль признака свёртывания листа изучена недостаточно.

Полевые исследования показали, что в условиях засухи сорта пшеницы со свёрнутыми листьями являются более продуктивными по сравнению с генотипами, не имеющими данный признак (Омарова и др., 1995). Поскольку фотосинтез является основным метаболическим процессом, обеспечивающим образование биомассы и, в конечном итоге, продуктивность растений, особый интерес представляет изучение адаптационного потенциала фотосинтетического аппарата свёрнутых листьев в условиях засухи.

Накопление биомассы, в свою очередь, в значительной мере определяется водным обменом (Blum, 1996). Считается, что устойчивость к засухе определяется наличием прямой взаимосвязи между накоплением биомассы и эффективностью водного обмена растений (Шматько и др., 1987).

Следует отметить, что засуха является сложным интегральным стрессовым фактором. Основными составляющими засухи, подавляющими процессы жизнедеятельности растений, считаются высокая интенсивность солнечной радиации, температура воздуха и водный дефицит (Levitt, 1980; Demmig-Adams, Adams, 1992). В связи с этим особую актуальность приобретают исследования, направленные на выявление значимости составляющих засухи в проявлении адаптационного потенциала морфофизиологического признака свёртывания листа.

Цель и задачи исследования. Целью работы является выяснение физиолого-биохимической роли признака свёртывания листа в повышении засухоустойчивости у пшеницы.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- выявление взаимосвязи параметров водного обмена и продуктивности у генотипов пшеницы с введённым признаком «свёрнутый лист»
- определение влияния интенсивности света на пигментный состав, параметры CO_2 -газообмена и фотохимическую активность хлорофилла у генотипов пшеницы, различающихся по степени свёртывания листа
- установление температурно-обусловленных изменений фотосинтеза флаговых листьев генотипов пшеницы с различным проявлением свёртывания листа
- определение основных параметров фотосинтеза у генотипов пшеницы, различающихся по степени свёртывания листа, при действии водного дефицита
- установление физиологической роли апопластных форм пероксидазы в свёртывании листа пшеницы

Научная новизна работы. Показано, что высокая продуктивность сортов пшеницы с введённым признаком свёртывания листа обуславливается сохранением биомассы флаговых листьев в период цветения-молочной спелости при нарастании засухи.

Впервые установлено, что генотипы пшеницы Грекум-476, Отан и Альба, вне зависимости от степени проявления свёртывания листа, имеют наибольший потенциал адаптации фотосинтетического аппарата к действию высокой интенсивности света. Установленная закономерность обусловлена стабильной (Грекум-476) и высокой (Отан и Альба) фотохимической активностью фотосистемы II.

Впервые показано, что генотипы с наибольшим проявлением свёртывания Грекум-476 и Отан при действии температуры 40°C в течение 2 дней характеризуются высоким адаптационным потенциалом фотосинтетического аппарата и являются устойчивыми к фотоингибированию фотосинтеза. Основными факторами, обуславливающими устойчивость этих генотипов, являются стабильная фотохимическая активность фотосистемы II, устьичная регуляция транспирации воды и снабжение клеток мезофилла углекислотой.

В условиях водного дефицита наибольшая степень свёртывания листа позволяет сохранять высокую фотохимическую активность фотосистемы II и адаптационный потенциал фотосинтетического аппарата, несмотря на снижение скорости фотосинтеза. Максимальной устойчивостью при водном дефиците на уровне фотосинтеза и фотохимической активности фотосистемы II обладает сорт Альба, имеющий среднюю степень свёртывания листа.

Таким образом, на основании установленных закономерностей функционирования фотосинтетического аппарата при засухе классифицировано, что генотипы с признаком свёртывания листа обладают высоким потенциалом адаптации к действию светового стрессора (Отан и Альба), высокой температуры (Грекум-476 и Отан) и водного дефицита (Грекум-476, Отан и Альба).

Впервые определена взаимосвязь между изменением в зональном распределении апопластных форм пероксидазы клеточной стенки во флаговом листе у генотипов пшеницы и свёртыванием листьев. Установлено, что увеличение активности пероксидазы клеточной стенки в зонах 2-9, соответствующих 3-13,5

см от основания листа, у сортов Отан и Альба сопровождается изменением термостабильности фермента в интервале температур 45°C - 55°C. Это свидетельствует о существовании различных форм фермента, которые могут выполнять разные физиологические функции, в частности, могут участвовать в свёртывании листа посредством изменения эластичных свойств клеточной стенки.

Практическая значимость работы. Установленные физиолого-биохимические изменения у генотипов пшеницы с признаком «свёрнутый лист» к действию различных составляющих засухи: высокой интенсивности света, высокой температуры и водного дефицита вносят существенный вклад в развитие теории устойчивости растений, на основе которой ведётся создание устойчивых генотипов с использованием адаптивных морфофизиологических признаков. Полученную новую научную информацию рекомендуется использовать при преподавании спецкурсов по устойчивости растений и экологической физиологии растений в высших учебных заведениях.

Выявлены тестовые признаки: скорость нетто-фотосинтеза P_N , скорость уменьшения флуоресценции хлорофилла в области 690 нм (RFd 690), индекс адаптации фотосинтетического аппарата к стрессу A_p , активность пероксидазы клеточной стенки, которые рекомендуется использовать для оценки адаптационного потенциала генотипов в селекционном процессе.

Установленные закономерности функционирования водного обмена и фотосинтетического аппарата в зависимости от степени проявления признака «свёрнутый лист» позволяют корректно оценить адаптационные возможности генотипов и могут служить физиологическим обоснованием в селекционно-генетических программах с учётом степени воздействия основных составляющих засухи в конкретных экологических зонах возделывания пшеницы.

Основные положения, выносимые на защиту.

- Генотипы пшеницы с признаком «свёрнутый лист» имеют высокий адаптационный потенциал фотосинтетического аппарата к действию основных составляющих засухи: высокой интенсивности света, высокой температуры и водного дефицита. Адаптация фотосинтетического аппарата происходит на уровне фотосистемы II, путём приобретения устойчивости к фотоингибированию и выражается в стабильной фотохимической активности.

- Фотосинтетический аппарат сорта Омская-9, не имеющего признак свёртывания листа, чувствителен к действию основных составляющих засухи: высокой интенсивности света, высокой температуры и водного дефицита. Детерминирующим фактором, обуславливающим снижение скорости фотосинтеза, является ингибирование фотохимической активности фотосистемы II.

- Свёртывание листовой пластинки связано с высокой активностью ионно-связанной и ковалентносвязанной пероксидазы клеточной стенки. По-видимому, увеличение активности апопластных форм пероксидазы в листовой пластинке обусловлено термостабильностью фермента в интервале температур 45°C - 55°C.

Апробация результатов работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены: на VII Республиканской научно-практической конференции «Физиолого-биохимические и генетические основы устойчивости и про-

дуктивности растений» (Алматы, 1999); на Республиканской научной конференции молодых учёных и студентов «Актуальные вопросы современной биологии и биотехнологии» (Алматы, 2000); на Международной научно-практической конференции «Спонсируемые биотехнологические разработки в Казахстане и проблемы нераспространения» (Степногорск, 2000); на 2 Balkan Botanical Congress (Istanbul, 2000); на 3 International Crop Science Congress (Hamburg, 2000); на 13 FESPP Congress (Крит, 2002); на 12-й Australian Plant Breeding Conference (Perth Western Australia, 2002); на 1-й Международной Конференции по пшенице (Алматы, 2003); на 3-м съезде ВОГИС «Генетика в 21 веке: современное состояние и перспективы развития» (Москва, 2004); на 4 International Crop Science Congress (Australia, 2004).

Работа выполнена в рамках 5 плановых научно-исследовательских программ ИФГБР МОН РК, поддержана стипендиями международных фондов DAAD (ФРГ), FAO/IAEA (Австрия) и Российско-Германского колледжа при Университете Карлсруэ (ФРГ).

Публикация результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 9 статей и 6 тезисов, в т. ч. 4 статьи в международных изданиях.

Объём и структура диссертации. Диссертация объёмом 107 страниц состоит из введения, обзора литературы, условий, объектов и методов, 3 разделов экспериментальных исследований, выводов и списка использованных источников, включающих 242 наименования; содержит 15 таблиц и 21 рисунок.

2 Условия, объекты и методы исследования

Исследования проводились в условиях фитотрона Института физиологии, генетики и биоинженерии растений МОН РК (1998-2000 гг.); в факторостатных условиях теплицы Института ботаники Университета Карлсруэ, ФРГ (2001-2003 гг.). Полевые опыты проводились на экспериментальных участках Научно-производственного центра земледелия и растениеводства МСХ.

Объектами исследования служили сорта мягкой яровой пшеницы Отан (BC5) и Альба (BC3) с введённым признаком «свёрнутый лист», а также родительский сорт Омская-9 (обычная морфология листа) и константная линия Грекум-476 (донор признака «свёрнутый лист»).

Сорта Отан и Альба были получены методом индивидуального отбора из гибридной комбинации (Грекум-476 × Омская-9) × Омская-9. При этом сорт Отан несёт два доминантных гена *R11* и *R12*, сорт Альба - один *R1* ген.

Все физиолого-биохимические анализы проводили на флаговых листьях генотипов пшеницы. Общее содержание воды в почве в течение вегетации измеряли по методу Жолкевич и Пустовойтовой (1993). Сухую массу определяли после высушивания при 80°C в течение 48 ч.

Относительное содержание воды определяли по методу H.D. Barts и P.E. Weatherley (1962), относительную потерю воды по методу I. Jamaux с соавторами (1997). Степень свёртывания листа рассчитывали по формуле (Saneoka et al., 1995). Интенсивность падающей фотосинтетически активной радиации (ФАР) на уровне флагового листа определяли портативным порометром (Li-1600, Li-COR, Lincoln, NE, USA).

Для экспериментов по изучению интенсивности фотосинтеза и фотохимической активности хлорофилла растения пшеницы выращивали в теплицах в сосудах на питательной торфяной смеси ТКС II при следующих условиях: температура воздуха 15°C/10°C (день/ночь); интенсивность освещения 300 $\mu\text{моль м}^{-2}\text{с}^{-1}$ (умеренный свет) или 1200 $\mu\text{моль м}^{-2}\text{с}^{-1}$ (высокий свет); относительная влажность воздуха 70%. Полив проводили до влажности почвы 75% от полной полевой влагоёмкости. Для экспериментов использовали 80-дневные растения.

Условия температурного перегрева создавали в камерах с регулируемым режимом путём постепенного увеличения температуры до 40°C (скорость повышения - 0,13 °C/мин, температура 40°C достигалась через 2 часа). Продолжительность воздействия высокой температурой была 7 часов, остальное время суток поддерживали 20°C. В общей сложности растения подвергали жёсткому температурному стрессу в течение 2 дней. Водный дефицит создавали, удерживая полив растений в течение 8 дней.

Определение параметров газообмена флаговых листьев *in vivo* проводили на CO₂-H₂O-порометре (СНР-5К, Walz, Effeltrich, ФРГ). Формулы расчётов скорости нетто-фотосинтеза, устьичной проводимости для воды, транспирации, эффективности использования воды и внутриклеточного содержания CO₂ использованы согласно G. Schmuck (1986).

Определение кинетики флуоресценции хлорофилла осуществляли на РАМ-флуорометре (Walz, Effeltrich) после определения параметров газообмена по методике U. Rinderle (1990), а также с помощью LITWaF-флуорометра (Georgieva, Lichtenthaler, 1999).

Параметры фотохимической активности хлорофилла:

Fv/Fm - отношение переменной флуоресценции к максимальной

Fv/Fo – отношение переменной флуоресценции к фоновой.

RFd 690=Fd/Fs – скорость уменьшения флуоресценции в области 690 нм до постоянной величины Fs.

RFd 735=Fd/Fs – скорость уменьшения флуоресценции в области 735 нм до постоянной величины Fs.

Используя показатели RFd 690 и RFd 735, дополнительно рассчитывали индекс адаптации к стрессу: **Ap =1-(1+RFd 735)/(1+RFd 690)** (Strasser et al., 1987).

Определение пигментов: хлорофилла *a* и *b* (*a+b*), суммы каротиноидов и ксантофиллов (*x+c*) после экстракции в 100% ацетоне проводили фотометрически по методу Lichtenthaler (1987). Относительное содержание суммы каротиноидов и ксантофиллов (*x+c*) выражали в % от содержания хлорофилла (*a+b*).

Интенсивность флуоресценции флаговых листьев в синей области спектра измеряли на спектрометре (Perkin Elmer, LS-50 Luminescence Spectrometer, Übelingen, Germany).

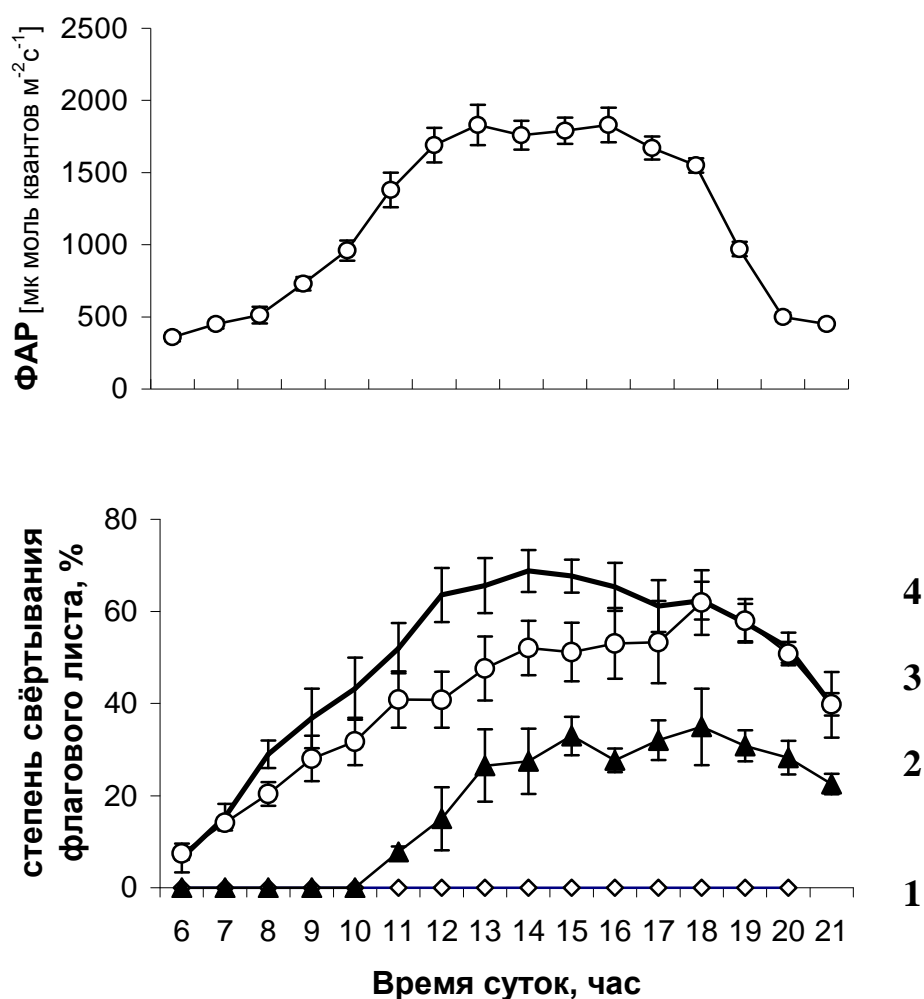
Выделение ионносвязанной и ковалентносвязанной форм пероксидазы клеточной стенки проводили в фазу цветения (Гамбург и др., 1977). Активность пероксидазы в реакции с бензидином определяли по методу Бояркина (1962). За единицу активности пероксидазы принимали изменение плотности за мин. и рассчитывали как активность на г. сырой массы. Для изучения зонального рас-

пределения пероксидазы флаговые листья сегментировали длиной 1,5 см от основания листовой пластинки. Для определения термостабильности апопластных форм пероксидазы ферментные препараты прогревали в течение 2 часов при температурах 35°C, 45°C, 55°C и 65°C.

Статистическую значимость различий оценивали по t-Тесту. На рисунках представлены средние арифметические данные и ошибка среднего ($\pm SE$).

3 Взаимосвязь водного обмена и продуктивности у генотипов пшеницы с признаком «свёрнутый лист»

3.1 Определение степени свёртывания листа и продуктивности сортов пшеницы. При изучении суточной динамики проявления признака «свёрнутый лист» установлено, что генотипы значительно различаются (рис. 1).



Обозначения кривых: Омская-9 (1); Альба (2); Отан (3); Грекум-476 (4)

Рис. 1. Суточная динамика изменений фотосинтетически активной радиации (ФАР) и степени свёртывания флагового листа генотипов пшеницы

Раннее свёртывание флагового листа (в 6 час утра), совпадающее с низкой интенсивностью падающей фотосинтетически активной радиации (ФАР, 500 $\mu\text{моль м}^{-2}\text{с}^{-1}$) наблюдали у генотипов Грекум-476 и Отан (рис. 1). У сорта Альба признак свёртывания листа начинал проявляться значительно позднее (в 11 час) при возрастании ФАР до 1500 $\mu\text{моль м}^{-2}\text{с}^{-1}$. В период с 11 до 15 час в условиях максимальной ФАР все исследуемые генотипы имели наибольшую степень свёртывания листа. Снижение интенсивности ФАР (после 18 ч. вечера) сопровождалось уменьшением свёртывания листа.

По степени выраженности свёртывания листовой пластинки генотипы пшеницы классифицированы нами как линия Грекум-476 с наибольшей степенью свёртывания (50-65% от абсолютной ширины листовой пластинки), сорт Отан – высокой (40-50%) и сорт Альба – средней степенью свёртывания листа (25-30%).

Анализ элементов продуктивности сортов пшеницы, различающихся по степени свёртывания листа, показал, что генотипы с введённым признаком свёртывания листа превышали родительский сорт Омская-9 по большинству признаков: числу зёрен в колосе, весу зерна главного колоса, массе 1000 зёрен. По полевой урожайности генотипы Грекум-476 и Отан достоверно превышали сорт Омская-9.

Сравнение накопления биомассы флаговых листьев пшеницы в фазы колошения и молочной спелости, характеризующиеся усилением засухи, выявляет, что сухая масса у сортов Омская-9 и Альба не изменяется. У сорта Отан засуха снижала сухую массу флаговых листьев на 30%.

3.2 Изменение параметров водного обмена у генотипов пшеницы с различной степенью свёртывания листа при засухе. Накопление биомассы при засухе в значительной мере определяется эффективностью водного обмена (Шматько и др., 1987; Blum, 1996). В связи с этим представляло интерес изучение основных показателей водного обмена листьев у сортов пшеницы, различающихся по степени свёртывания в период цветения – молочной спелости при нарастании засухи.

Относительное содержание воды во флаговых листьях сортов Омская-9, Отан и Альба снизилось на 10%.

Показатель «относительная потеря воды» считается физиологическим маркером осмотического регулирования и одним из критериев при отборе устойчивых к засухе генотипов (Jamaux et al., 1997; Clarke, McCaig, 1982). Относительная потеря воды варьировала в зависимости от фазы развития растений: в фазу цветения сорт Отан имел максимальные значения (61%). Наименьшая относительная потеря воды установлена у сорта Альба (33%) и сорт Омская-9 занимал промежуточное положение (45%). В фазу молочной спелости относительная потеря воды флаговых листьев сортов Омская-9 и Альба значительно увеличилась. Генотипические различия при этом нивелировались.

Выявлено, что эффективность использования воды при умеренной засухе в период цветения-молочной спелости повышалась на 80% в листьях сорта Альба. У сорта Отан эффективность использования воды оставалась достаточно

высокой, несмотря на снижение содержания воды и биомассы флаговых листьев.

Нами был проведён корреляционный анализ взаимосвязей между массой 1000 зёрен - основным показателем продуктивности и накоплением биомассы листа. Установлено, что у сортов с признаком «свёрнутый лист» масса 1000 зёрен тесно связана с сохранением биомассы флагового листа ($r^2=0,69-0,82$).

Для всех исследуемых сортов вне зависимости от наличия признака и степени его проявления выявлена тесная положительная взаимосвязь между параметрами водного обмена (относительное содержание и относительная потеря воды) и массой 1000 зёрен ($r^2=0,67-0,87$), что свидетельствует о важной роли водного обмена листьев в формировании продуктивности пшеницы в условиях засухи.

4 Фотосинтетическая активность листьев у сортов пшеницы при действии различных составляющих засухи

4.1 Влияние интенсивности света на пигментный состав, параметры CO_2 -газообмена и фотохимическую активность фотосистемы II у генотипов пшеницы, различающихся по степени свёртывания листа. Фотосинтез является основным метаболическим процессом, определяющим формирование биомассы растений. Одной из важнейших составляющих засухи, подавляющей фотосинтетическую активность, является высокая интенсивность света (Horton, 2000; Anderson, 1995). Известно, что процессы адаптации растений к условиям освещения в первую очередь затрагивают структуру и функцию хлоропластов (Lichtenthaler, 1982; Demmig-Adams, Adams, 1996).

Обнаруженный нами у генотипов Отан, Грекум-476 и Альба схожий характер изменений суточной динамики ФАР и увеличения степени свёртывания листовой пластинки (рис. 1) позволяет заключить, что этот феномен проявляется как ответная реакция на действие светового стрессора. Поэтому задачей следующих экспериментов было изучение влияния высокой и умеренной интенсивности света на структурно-функциональное состояние фотосинтетического аппарата и его адаптационный потенциал у генотипов пшеницы, различающихся по степени свёртывания листа. В связи с этим были определены общее содержание хлорофилла, отношение хлорофилла a/b, относительное содержание каротиноидов и ксантофиллов, скорость фотосинтеза и параметры CO_2 -газообмена флаговых листьев, показатели фотохимической активности хлорофилла.

В результате определения пигментного состава флаговых листьев пшеницы установлено, что под действием высокой интенсивности света ($1200 \mu\text{моль м}^{-2}\text{с}^{-1}$) общее содержание хлорофилла (a+b) уменьшается у сорта Отан на 26%. Что касается других генотипов пшеницы, общее содержание хлорофилла в этих условиях не изменялось.

Выявленное отсутствие изменений отношения хлорофилла a/b в условиях умеренной ($300 \mu\text{моль м}^{-2}\text{с}^{-1}$) и высокой интенсивности света у всех генотипов

пшеницы свидетельствует о стабильной структуре фотосинтетического аппарата флаговых листьев.

При анализе относительного содержания каротиноидов и ксантофиллов, рассчитанного к общему содержанию хлорофилла, обнаружена тенденция к его увеличению у сортов без свёртывания листа (Омская-9) и со слабым его проявлением (Альба) при действии света высокой интенсивности. У генотипов с высокой степенью свёртывания этот показатель не изменялся. Известно, что накопление каротиноидов и ксантофиллов, благодаря их непосредственному участию в рассеянии избытка поглощённой хлорофиллом энергии, является одним из основных механизмов защиты пигментов от фотоокисления (Demmig-Adams, Adams, 1992). Поэтому накопление каротиноидов и ксантофиллов в листьях сортов Омская-9 и Альба можно рассматривать как один из механизмов, предохраняющих фотосинтетический аппарат от фотоингибирования высокой интенсивностью света.

Данные анализа пигментов (содержание хлорофилла, отношение a/b, относительное содержание каротиноидов и ксантофиллов) у всех генотипов пшеницы вне зависимости от наличия и степени проявления признака «свёрнутый лист» показывают, что в условиях высокой интенсивности света не происходят структурные изменения фотосинтетического аппарата флаговых листьев пшеницы.

Для определения пункта светового насыщения фотосинтеза флаговых листьев пшеницы измеряли скорость фотосинтеза при возрастающей интенсивности света. Световое насыщение фотосинтеза у всех сортов пшеницы вне зависимости от наличия признака свёртывания листа происходило при 1000-1200 $\mu\text{моль квантов м}^{-2}\text{с}^{-1}$.

При умеренной интенсивности света скорость фотосинтеза была одинакова у всех генотипов пшеницы ($9,51 \pm 0,87 \mu\text{моль CO}_2 \text{ м}^{-2}\text{с}^{-1}$). Под влиянием высокой интенсивности освещения скорость фотосинтеза у растений родительского сорта Омская-9 снизилась на 30%. У генотипов с признаком «свёрнутый лист» световой стрессор не оказывал влияния на этот показатель (Грекум-476, донор признака свёртывания листа), но повышал скорость фотосинтеза у сортов Отан и Альба (на 24-30%).

Известно, что процесс фотосинтеза регулируется устьичным механизмом, включающим в себя транспирацию воды и снабжение клеток мезофилла углекислотой (Pastenes, Horton, 1996; Mohotti, Lawlor, 2001). В связи с этим нами были определены устьичная проводимость и внутриклеточное содержание CO_2 во флаговых листьях пшеницы.

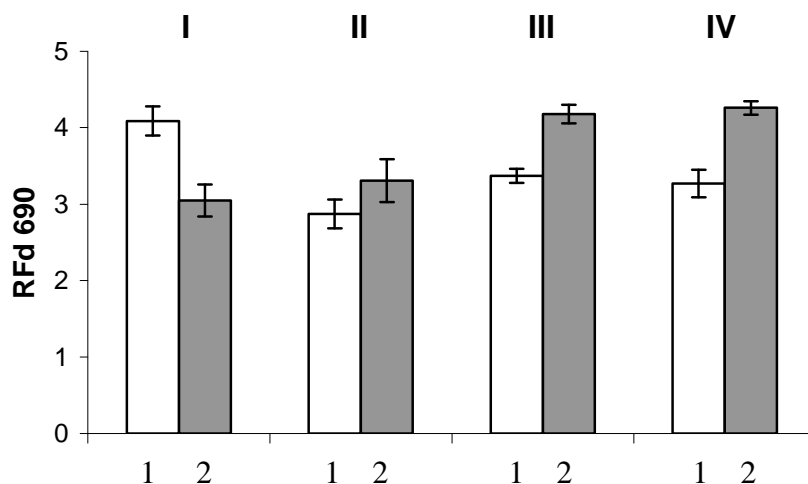
Установлено, что устьичная проводимость у Омской-9 и Грекум-476 в условиях высокой интенсивности света оставалась без изменений, но значительно повысилась у сортов Отан и Альба (на 45 и 77%, соответственно). Внутриклеточное содержание CO_2 у всех сортов пшеницы было выше при высокой интенсивности света по сравнению с таковым в условиях умеренного света, что позволяет считать, что устьичный контроль посредством снабжения клеток мезофилла углекислотой не лимитирует фотосинтез.

Выявленные закономерности по изменению устьичной проводимости и внутриклеточного содержания CO_2 под действием света высокой интенсивности позволяют считать, что в адаптации фотосинтеза посредством устьичного механизма основная роль принадлежит процессу транспирации воды.

Другим важным фактором, регулирующим функцию фотосинтетического аппарата растений, считается фотохимическая активность фотосистемы II (Govindjee, 1995; Bukhov, Carpentier, 2000). Поэтому нами было предпринято изучение влияния умеренной и высокой интенсивности света на фотохимическую активность фотосистемы II как наиболее чувствительного компонента фотосинтетического аппарата (Bukhov et al., 1998; Егорова и др., 2003) у сортов пшеницы с различным проявлением свёртывания листа. Об активности фотосистемы II в первичных фотохимических реакциях судили по изменению основных параметров флуоресценции хлорофилла, а именно отношению переменной флуоресценции к фоновой F_v/F_o , отношению переменной флуоресценции к максимальной F_v/F_m , скорости уменьшения флуоресценции в двух максимумах флуоресценции хлорофилла: при 690 нм (RFd 690) и 735 нм (RFd 735).

Высокая интенсивность света не влияла на величины F_v/F_m и F_v/F_o у всех сортов пшеницы. Это свидетельствует об отсутствии структурных изменений в антенных комплексах и реакционных центрах фотосистемы 2 у генотипов пшеницы вне зависимости от наличия и степени проявления свёртывания листа.

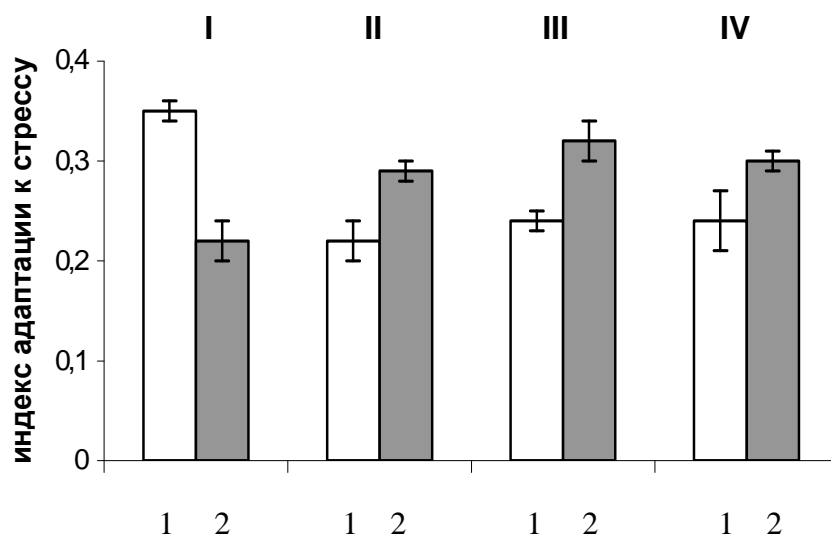
При определении скорости уменьшения флуоресценции в области 690 нм (RFd 690) нами обнаружены отчётливые генотипические различия (рис. 2). У сортов Отан и Альба высокая интенсивность света вызывала значительное повышение данного показателя.



Обозначения: умеренная интенсивность света (1); высокая интенсивность света (2); сорта Омская-9 (I); Грекум-476 (II); Отан (III); Альба (IV)

Рис. 2. Влияние света различной интенсивности на функциональную активность фотосистемы 2 (показатель RFd 690) флаговых листьев сортов пшеницы, различающихся по степени свёртывания листа

У родительских сортов световой стрессор приводил к снижению значения RFd 690 (Омская-9), и не оказывал влияния на этот параметр у Грекум-476 (рис.2). Снижение показателя RFd 690 у Омской-9 на фоне стабильных значений отношений Fv/Fm и Fv/Fo свидетельствует об ингибировании транспорта электронов между фотосистемами II и I и, согласно мнению ряда исследователей (Krause, Weiss, 1991; Osmond, 1994; Herrmann et al., 1997), характеризует первую фазу фотоингибирования фотосинтеза. У сортов Отан и Альба (наибольшая и средняя степень свёртывания листа) высокая интенсивность света приводила к значительному повышению RFd 690, что сопровождалось возрастанием адаптационного потенциала фотосинтетического аппарата Ap (рис. 3).



Обозначения: умеренная интенсивность света (1); высокая интенсивность света (2); сорта Омская-9 (I); Грекум-476 (II); Отан (III); Альба (IV)

Рис. 3. Индекс адаптации к стрессу флаговых листьев сортов пшеницы, различающихся по степени свёртывания, в условиях умеренной и высокой интенсивности света

Таким образом, выращивание растений в условиях умеренной и высокой интенсивности света выявило генотипические особенности, связанные с феноменом свёртывания листа, в функционировании фотосинтетического аппарата у пшеницы. При действии светового стрессора происходит снижение скорости фотосинтеза и адаптационного потенциала фотосинтетического аппарата у сорта Омская-9, не имеющего этот признак. Такая чувствительность обусловлена ингибированием фотохимической активности фотосистемы II.

Напротив, у сортов с признаком свёртывания листа высокая интенсивность света не оказывала влияния на скорость фотосинтеза, что было обусловлено устойчивостью к фотоингибированию фотосинтеза флаговых листьев. Более того, сорта Отан и Альба с введённым признаком «свёрнутый лист» имеют более высокий адаптационный потенциал фотосинтеза. По результатам проведённых экспериментов можно заключить, что адаптивная роль признака свёртывания

листа заключается в эффективной защите фотосинтетического аппарата от фотоингибирования высокой интенсивностью света.

4.2 Температурно-обусловленные изменения фотосинтеза у генотипов пшеницы, различающихся по степени свёртывания листа. В засушливых условиях с повышением интенсивности света, как правило, возрастает температура воздуха и, как следствие, водный дефицит (Price et al., 2002), другие важнейшие факторы, регулирующие функцию фотосинтетического аппарата растений (Levitt, 1980; Полимбетова, 1986). В связи с этим представлялось необходимым изучение закономерностей функционирования и адаптационного потенциала фотосинтетического аппарата у генотипов пшеницы с введённым признаком свёртывания листа к действию высокой температуры.

С этой целью 80-дневные растения пшеницы выдерживали в камерах при температуре 40°C в течение 2 дней. Скорость возрастания и обратного уменьшения температуры составляла 0,13 градуса в минуту, что создавало в общей сложности 7 часовой прогрев растений при 40°C в сутки. В качестве контроля служили растения пшеницы, не подвергавшиеся влиянию температурного стресса.

Установлено температурно-обусловленное снижение содержания хлорофилла (a+b) у сортов Омская-9 и Альба (на 26% и 37%, соответственно по сравнению с контролем). Тенденция к снижению содержания хлорофилла выявлена у Грекум-476 (на 13%). Кроме того, у сортов Омская-9, Отан и Альба обнаружено заметное снижение отношения a/b. У всех сортов после обработки растений температурой 40°C возросло содержание каротиноидов и ксантофиллов (x+c). При этом максимальный их уровень характерен для сорта Альба.

Выявлено, что при действии температуры скорость фотосинтеза в листьях Омской-9 снижалась на 30% по сравнению с контролем и, в меньшей мере, у сорта Альба, характеризующегося средней степенью свёртывания листа (на 16%). У генотипов с наибольшей степенью свёртывания листа Грекум-476 и Отан в этих условиях скорость фотосинтеза не изменялась.

Устьичная проводимость и интенсивность транспирации воды являются важными факторами, оказывающими влияние на скорость фотосинтеза при высокой температуре (Hsiao et al., 1984; Dingkuhn et al., 1989). Поэтому представлялось целесообразным выявить роль устьичной регуляции в температурно-обусловленном изменении фотосинтеза у сортов пшеницы, различающихся по степени свёртывания листа.

Под действием температуры 40°C скорость транспирации значительно снижалась у линии Грекум-476 (на 45% по сравнению с контролем), в меньшей степени - у сорта Отан (на 11%). В листьях сорта Омская-9 установлена тенденция к повышению этого показателя на 12%.

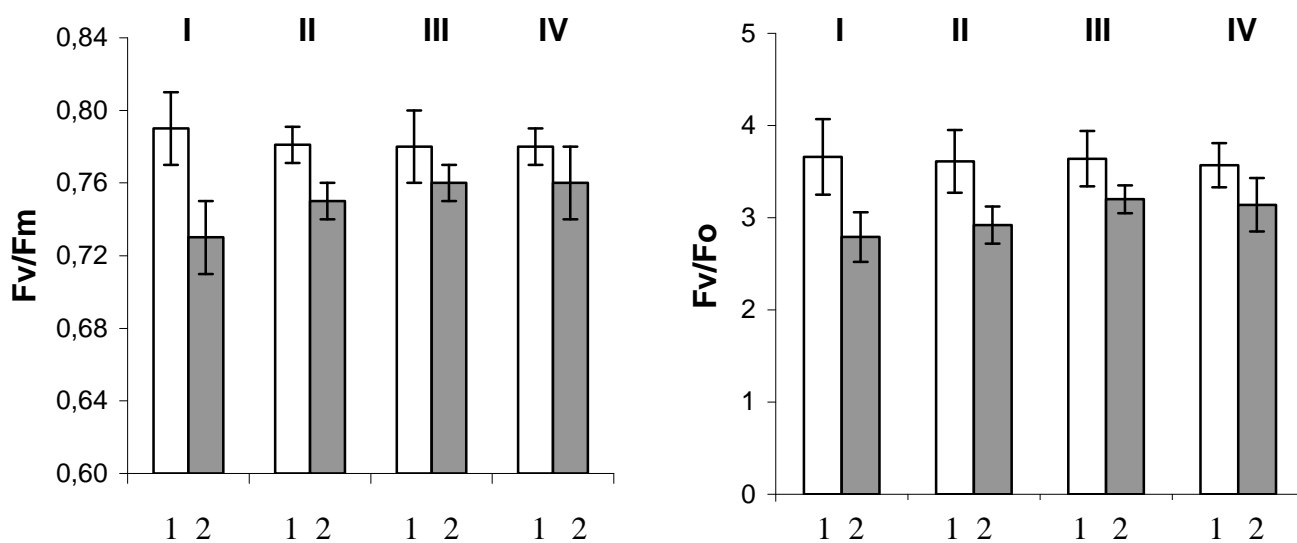
Известно, что увеличение устьичной проводимости в условиях экстремально высокой температуры способствует лучшему охлаждению листьев и является физиологической ответной реакцией растений на перегрев (Pastenes, Horton, 1996). В то же время, снижение устьичной проводимости и, как следствие, уменьшение интенсивности транспирации воды считается адаптивным ответом организма, предотвращающим её потерю при действии засухи и других небла-

гоприятных факторов (Clifford et al., 2000; Pardossi et al., 1998). Согласно полученным нами данным, установленные изменения в устьичной проводимости и транспирации воды у генотипов пшеницы со свёртыванием листа при действии высокой температуры свидетельствуют о позитивной роли устьичного контроля в адаптации фотосинтетического аппарата.

Внутриклеточное содержание CO_2 в листьях является другим важным компонентом устьичной регуляции процесса фотосинтеза (Mohotti, Lawlor, 2002). Характер взаимосвязи между поступлением CO_2 в клетки мезофилла листа и скоростью фотосинтеза неоднозначен (Tezara et al., 2002).

Установлено, что внутриклеточное содержание CO_2 в листьях незначительно снижалось у Грекум-476 (на 10% по сравнению с контролем) и не изменялось у сортов Омская-9, Альба и Отан. Сравнение устьичной проводимости и внутриклеточного содержания CO_2 , основных элементов устьичного контроля фотосинтеза, позволяет заключить, что снижение транспирации воды выполняет решающую роль в адаптации фотосинтетического аппарата к действию высокой температуры у сортов с признаком «свёрнутый лист».

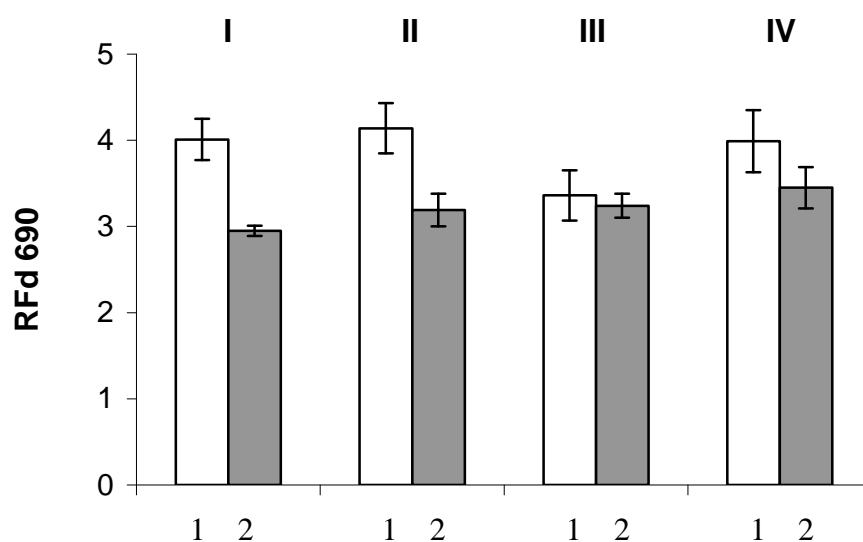
Определение параметров флуоресценции хлорофилла показывает, что выдерживание растений пшеницы сорта Омская-9 при температуре 40°C существенно снижает значения F_v/F_m , F_v/F_o и $\text{RFd } 690$ (рис. 4,5).



Обозначения: контроль (1); воздействие температурой 40°C в течение 2 дней (2); сорта Омская-9 – отсутствует признак свёртывания листа (I); Альба - средняя степень свёртывания (II); Грекум-476 - наибольшая степень свёртывания (III); Отан - высокая степень свёртывания (IV)

Рис. 4. Влияние высокой температуры (40°C в течение 2 дней) на показатели фотохимической активности фотосистемы 2 (F_v/F_m и F_v/F_o) флаговых листьев сортов пшеницы с различной степенью свёртывания листа

Аналогично сорту Омская-9, уменьшение показателей флуоресценции хлорофилла было обнаружено у сорта Альба (рис. 4, 5).



Обозначения: контроль (1); воздействие температурой 40°C в течение 2 дней (2); сорта Омская-9 (I); Альба (II); Грекум-476 (III); Отан (IV)

Рис. 5. Влияние высокой температуры (40°C в течение 2 дней) на функциональную активность фотосистемы 2 (показатель RFd 690) флаговых листьев сортов пшеницы с различной степенью свёртывания листа

Такая закономерность позволяет заключить, что высокая температура вызывает структурно-функциональные повреждения фотосистемы II у сортов Омская-9 (отсутствие свёртывания) и Альба (среднее свёртывание) на уровне антенных комплексов (показатель Fv/Fm), реакционных центров (показатель Fv/Fo) и транспорта электронов (RFd 690).

В противоположность сортам Омская-9 и Альба, при воздействии высокой температуры все показатели, характеризующие фотохимическую активность фотосистемы II (Fv/Fm, Fv/Fo и RFd 690), не изменялись у генотипов Грекум-476 и Отан, имеющих наибольшую степень свёртывания листа (рис. 4, 5). Повышение температуры не влияло на индекс адаптации фотосинтетического аппарата к стрессу у этих генотипов пшеницы, значения которых оставались достаточно высокими (0,29-0,3).

Суммируя полученные данные, можно заключить, что свёртывание листа способствует стабилизации структурно-функционального состояния фотосистемы II при действии температурного стресса.

Итак, при действии высокой температуры - одной из важнейших составляющих засухи, в наибольшей степени снижается скорость фотосинтеза флаговых листьев у сорта Омская-9 и, в меньшей мере, у сорта Альба, что связано с нарушениями в структурно-функциональном состоянии фотосинтетического аппарата. Эти сорта пшеницы можно характеризовать как наиболее чувствительные к действию высокой температуры.

У генотипов с наибольшей степенью свёртывания листа Грекум-476 и Отан, как и при действии света высокой интенсивности, температурно-

обусловленная скорость фотосинтеза также не изменилась, что связано с устойчивостью фотосистемы II к фотоингибированию.

4.3 Изменения основных параметров фотосинтеза у генотипов пшеницы, различающихся по степени свёртывания листа, при водном дефиците. Наряду с высокой температурой и интенсивностью света широко распространённой составляющей засухи является водный дефицит. Поэтому задачей наших дальнейших исследований было изучение адаптационных изменений фотосинтетического аппарата свёрнутых листьев пшеницы при водном дефиците. Условия водного дефицита создавали путём прекращения полива растений в течение 8 дней (содержание воды в почве составило 62% от полной полевой влагоёмкости). Контролем служили растения, не подвергавшиеся водному дефициту.

Анализ пигментного состава флаговых листьев пшеницы показал, что при водном дефиците продолжительностью действия 8 дней уменьшается суммарное содержание хлорофилла (a+b) у сортов Отан и Альба (на 24% и 33% по сравнению с контролем, соответственно). Тенденция к снижению уровня хлорофилла выявлена у Грекум-476 и не обнаружено изменений у сорта Омская-9.

Снижение содержания хлорофилла является широко распространённой ответной реакцией растений на длительный водный дефицит (Loggini et al., 1999; Behera et al., 2002). Имеется мнение, что основной причиной падения уровня хлорофилла при действии водного дефицита является его окисление (Lichtenhaler et al., 1986; Murchie et al., 1999).

Установленное нами стабильное отношение хлорофилла a/b вне зависимости от генотип-обусловленных изменений общего содержания хлорофилла позволяет заключить, что водный дефицит не вызывает структурных изменений фотосинтетического аппарата флаговых листьев пшеницы.

У сорта Омская-9 водный дефицит слабо снижал скорость фотосинтеза (на 19% по сравнению с контролем). Скорость фотосинтеза также уменьшалась у генотипов пшеницы с наибольшим свёртыванием листа Отан и Грекум-476 (на 35% и 22%, соответственно). Водный дефицит не оказывал влияния на скорость фотосинтеза у сорта Альба со средней степенью свёртывания листа.

Как отмечалось ранее, снижение скорости фотосинтеза у генотипов Грекум-476 и Отан сопровождалось уменьшением интенсивности транспирации и устьичной проводимости. Что касается последнего показателя, его снижение при водном дефиците было наиболее ощутимым (на 52%). В листьях сорта Омская-9 водный дефицит также приводил к снижению интенсивности транспирации воды и устьичной проводимости (на 22% и 27%, соответственно). Аналогично скорости фотосинтеза, устьичная проводимость флаговых листьев сорта Альба не изменялась.

Под действием водного дефицита внутриклеточное содержание CO₂ во флаговых листьях сортов Грекум-476 и Отан уменьшилось на 11% и не изменялось в листьях остальных сортов. Таким образом, определение параметров CO₂-газообмена флаговых листьев сортов пшеницы с различной степенью свёр-

тывания листа выявило генотипические различия в чувствительности к водному дефициту.

Определение основных параметров флуоресценции хлорофилла в условиях водного дефицита показало значительное снижение значений F_v/F_m , F_v/F_o и RFd 690, характеризующих структурно-функциональные изменения фотосистемы II, в листьях сорта Омская-9. У генотипов с признаком свёртывания листа Грекум-476, Отан и Альба изменений этих параметров не установлено.

Значительное снижение значений F_v/F_m , F_v/F_o и RFd 690 у Омской-9 свидетельствует о повреждении структуры реакционных центров и антенных комплексов, а также об ингибировании транспорта электронов в условиях водного дефицита, в результате чего подавляется скорость фотосинтеза. В противоположность Омской-9, фотохимическая активность фотосистемы II менее чувствительна к действию водного дефицита у генотипов с признаком свёртывания листа Грекум-476, Отан и Альба.

Показано, что у Омской-9, не имеющей признака свёртывания листа, при водном дефиците снижается ассимиляционная и фотохимическая активность фотосинтетического аппарата, что позволяет идентифицировать данный сорт как чувствительный к влиянию этой составляющей засухи. В отличие от сорта Омская-9 снижение скорости фотосинтеза у генотипов Грекум-476 и Отан было обусловлено не уменьшением фотохимической активности фотосистемы II, а, по-видимому, ингибированием темновых реакций фотосинтеза.

Наиболее устойчивым к водному дефициту на уровне фотосинтеза и фотохимической активности фотосистемы II можно считать сорт Альба, характеризующийся средней степенью свёртывания листа.

Итак, изучение влияния водного дефицита на скорость фотосинтеза и фотохимическую активность фотосистемы II сортов пшеницы с различной степенью свёртывания флагового листа позволило выявить генотипические различия в устойчивости фотосинтетического аппарата к действию водного дефицита.

Для выявления вклада основных факторов, участвующих в регуляции процесса фотосинтеза у генотипов пшеницы с различным проявлением признака свёртывания листа при действии высокой интенсивности света, температуры и водного дефицита, нами был проведён корреляционный анализ взаимосвязи скорости фотосинтеза с внутриклеточным содержанием CO_2 , фотохимической активностью фотосистемы II и содержанием хлорофилла. Данные представлены в таблице 1.

Снижение скорости фотосинтеза у сорта Омская-9, обусловленное действием составляющих засухи, было наибольшим при высокой температуре, или иными словами, фотосинтетический аппарат наиболее чувствителен к этому стрессору. Как следует из данных таблицы 1, содержание хлорофилла (a+b) и фотохимическая активность фотосистемы II (показатель RFd 690) являются основными факторами, лимитирующими процесс фотосинтеза ($r^2=0,97$ и $0,61$, соответственно).

У родительской линии Грекум-476 (наибольшая степень свёртывания листа) снижение скорости фотосинтеза наблюдалось только при действии водного дефицита. На основании данных корреляционного анализа можно заключить,

что устьичная регуляция путём ограничения поступления CO_2 в клетки мезофилла является основной причиной подавления скорости фотосинтеза (таблица 1).

Таблица 1 – Коэффициенты корреляций (r^2) скорости фотосинтеза с внутриклеточным содержанием CO_2 , фотохимической активностью и содержанием хлорофилла у сортов пшеницы, различающихся по степени свёртывания листа, при действии различных составляющих засухи

Параметр	Генотип	Высокая интенсивность света	Высокая температура	Водный дефицит
Внутриклеточное содержание CO_2	Омская-9	-0,62	-0,79	-0,42
	Альба	0,86	-0,05	-0,21
	Грекум-476	0,14	0,67	0,97
	Отан	0,87	0,76	0,92
хлорофилл (a+b)	Омская-9	0,96	0,97	0,38
	Альба	0,10	0,93	0,57
	Грекум-476	0,38	0,82	0,03
	Отан	-0,52	0,46	0,60
RFd 690	Омская-9	0,87	0,61	0,89
	Альба	0,92	0,94	0,62
	Грекум-476	0,64	0,86	0,36
	Отан	0,94	0,78	0,35

Водный дефицит у сорта Отан с наибольшей степенью свёртывания листа как и для Грекум-476 является наиболее лимитирующей фотосинтез составляющей засухи. Данные таблицы 1 показывают, что снижение внутриклеточного содержания CO_2 и содержания хлорофилла вносят негативный вклад в снижение фотосинтетической активности.

В отличие от линии Грекум-476, у сорта Альба, характеризующегося средней степенью свёртывания листа, снижение скорости фотосинтеза в ответ на действие основных составляющих засухи выявлялось при высокой температуре. Как показывает корреляционный анализ, тесная взаимосвязь фотосинтеза со значениями RFd 690 и содержанием хлорофилла свидетельствует об определяющей роли фотохимической активности фотосистемы II и содержания хлорофилла в снижении скорости фотосинтеза (таблица 1).

Особый интерес представляло сравнение адаптационного потенциала (по индексу адаптации) фотосинтетического аппарата у генотипов пшеницы, раз-

личающихся по степени свёртывания листа, при действии ключевых составляющих засухи. Из литературы известно, что адаптационный потенциал характеризует способность фотосинтетического аппарата стабилизировать фотохимическую активность фотосистемы II при действии какого-либо стрессора (Lichtenthaler, Babani, 2003; Strasser et al., 1987). Показано, что значения индекса адаптации фотосинтетического аппарата к стрессору в пределах 0,30-0,33, свидетельствуют о его высокой адаптивной способности.

Нами установлено, что все составляющие засухи в одинаковой степени снижали адаптационный потенциал фотосинтетического аппарата у сорта Омская-9, не имеющего признак свёртывания листа (таблица 2).

Таблица 2 – Индексы адаптации фотосинтетического аппарата у сортов пшеницы, различающихся по степени свёртывания листа, при действии различных составляющих засухи

Генотип	Степень свёртывания	Высокая интенсивность света	Высокая температура	Водный дефицит
Омская-9	нет	0,22±0,02	0,23±0,02	0,24±0,01
Альба	средняя (25-30%)	0,31±0,01	0,27±0,01	0,33±0,01
Отан	высокая (40-50%)	0,32±0,02	0,3±0,02	0,30±0,01
Грекум-476	наибольшая (50-65%)	0,29±0,01	0,29±0,01	0,28±0,03

Линия Грекум-476 характеризуется средним уровнем адаптационного потенциала фотосинтетического аппарата вне зависимости от типа стрессора. Сорт Отан имел высокий (на уровне 0,3-0,33) адаптационный потенциал ко всем составляющим засухи: высокой интенсивности освещения, высокой температуре и водному дефициту. Для сорта Альба установлен наибольший потенциал адаптации фотосинтетического аппарата к действию водного дефицита и высокой интенсивности света. Наименьший адаптационный потенциал проявляется при действии температурного стрессора (таблица 2).

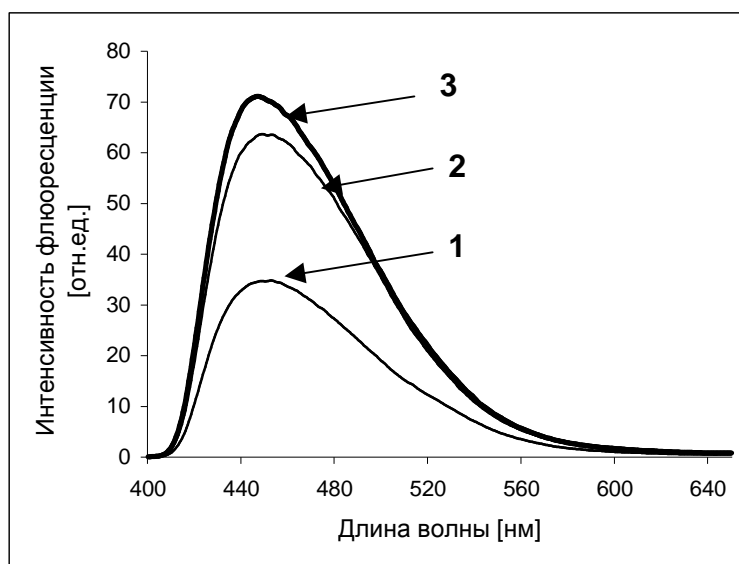
Можно обобщить, что физиологическая роль свёртывания листа заключается в снижении подавляющего фотосинтез эффекта высокой интенсивности света и высокой температуры. Обнаруженное нами свойство фотосистемы II, заключающееся в поддержании её фотохимической функции, способствует сохранению высокой скорости фотосинтеза у сортов с признаком «свёрнутый лист». Полученные данные расширяют современные представления о физиолого-биохимическом механизме адаптивного морфофизиологического признака «свёрнутый лист» к действию засухи.

5 Сопряжённость признака свёртывания листа с изменением свойств клеточной стенки

5.1 Связь интенсивности синей флуоресценции со свёртыванием листа у генотипов пшеницы. Известно, что интенсивность флуоресценции в синей области спектра тесно связана с накоплением в апопласте эпидермальных и верхних слоёв мезофилла флавоноидов, ковалентно связанных со структурными компонентами клеточной стенки и определяющих её эластичные свойства (Buschmann et al., 2000; Lichtenthaler, Schweiger, 1998). Среди ковалентно связанных с клеточной стенкой флавоноидов основными источниками синей флуоресценции являются феруловая, диферуловая и п-кумариловая кислоты (Lichtenthaler, Schweiger, 1998). В связи с этим представлялось целесообразным изучение интенсивности синей флуоресценции во флаговых листьях сортов пшеницы с различным проявлением признака свёртывания листа.

В экспериментах использовали 80-дневные растения, выращенные при температуре 15°C/10°C (день/ночь), интенсивности освещения 1200 $\mu\text{моль м}^{-2}\text{с}^{-1}$, относительной влажности воздуха 70%. Интенсивность флуоресценции флаговых листьев в синей области спектра измеряли на спектрометре (Perkin Elmer, LS-50 Luminescence Spectrometer, Übelingen, Germany).

В соответствии с результатами измерения для всех сортов пшеницы выявлялась характерная кривая зависимости интенсивности флуорес-



ценции от длины волны с пиком в синей области спектра 440-450 нм (рис. 6).

Обозначения кривых: Омская-9 – отсутствует признак свёртывания листа (1); сорт Альба – средняя степень свёртывания листа (2); Отан – наибольшая степень свёртывания листа (3)

Рис. 6. Интенсивность флуоресценции в сине-зелёной области спектра флаговых листьев сортов пшеницы, различающихся по степени свёртывания листа

Установлены значительные генотипические различия по величине пика: интенсивность флуоресценции у сортов Отан и Альба была значительно выше таковой по сравнению с сортом Омская-9 (рис. 6).

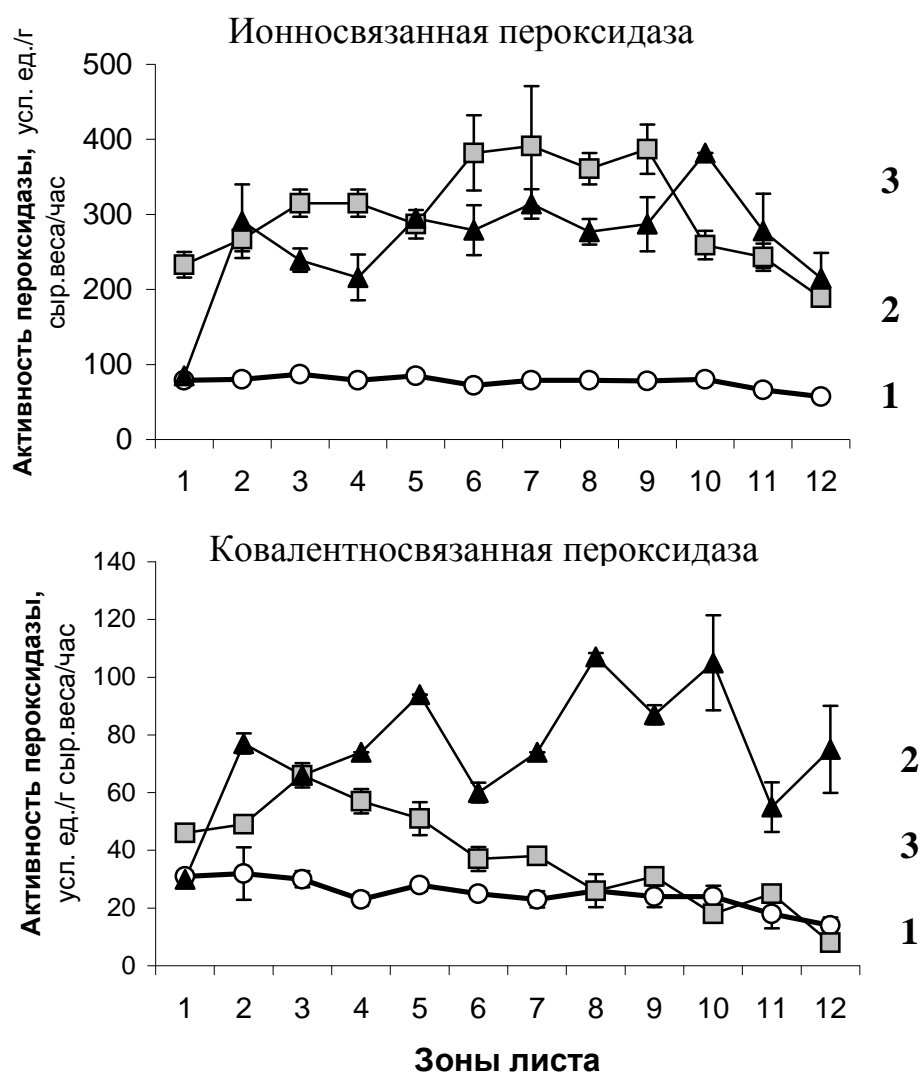
Поскольку интенсивность синей флуоресценции отражает степень накопления флавоноидов в клеточной стенке (Bilger et al., 2001), на основании полученных результатов по величине пика в интервале 440-450 нм можно предположить, что сортам пшеницы Отан и Альба, имеющим признак свёртывания листа, свойственен высокий уровень флавоноидов, связанных с клеточной стенкой.

5.2 Определение физиологической роли пероксидазы клеточной стенки в листьях генотипов пшеницы, различающихся по степени свёртывания. Ключевая роль апопластных форм пероксидазы, как основного агента в изменении эластичных свойств клеточной стенки, путём повышения её жёсткости в ответ на различные неблагоприятные факторы среды постулирована (MacAdam et al., 1992; Hoson et al., 1995; Thompson et al., 1997). Пероксидаза клеточной стенки катализирует реакцию образования диферуловой кислоты - основного флавоноида клеточной стенки, в результате чего увеличивается её жёсткость (Bakon et al., 1997; Wu, Cosgrove, 2000). Поэтому важно было выяснить физиологическую роль апопластных форм пероксидазы в вызываемом засухой свёртывании листовой пластинки у пшеницы. С этой целью определяли активность ионно- и ковалентносвязанных с клеточной стенкой форм пероксидазы во флаговых листьях генотипов пшеницы, различающихся по степени свёртывания, а также их зональное распределение в листовой пластинке в зависимости от степени свёртывания. Целесообразным было изучение термостабильности апопластных форм пероксидазы.

В этих экспериментах анализы проводили на флаговых листьях растений пшеницы, выращенных в условиях полевой засухи. Растительные пробы брали в 12 час дня, когда признак свёртывания листа проявляется наиболее отчётливо. Зональное распределение активности апопластных форм пероксидазы проводили в сегментах длиной 1,5 см от основания листовой пластинки.

Нами установлено, что активность ионно- и ковалентносвязанной пероксидазы клеточной стенки сортов Отан и Альба значительно выше по сравнению с таковой у Омской-9 (в 4,6 и 3 раза, соответственно). При изучении зонального распределения апопластных форм пероксидазы выявлено, что активность ионносвязанного фермента у Омской-9 распределена равномерно по всей длине листовой пластинки (рис. 7).

Активность ионносвязанной пероксидазы во флаговом листе сорта Отан представлена пиком в 6-9 зонах, соответствующих 9-12,5 см от основания листа. У сорта Альба максимальная активность выявлена в зоне 10, что соответствует 15 см листовой пластинки (рис.7).



Обозначения кривых: Омская-9 – не имеет признаков свёртывания (1); Альба – средняя степень свёртывания листа (2); Отан – наибольшая степень (3)

Рис. 7. Зональное распределение ионно- и ковалентносвязанной пероксидазы клеточной стенки во флаговых листьях сортов пшеницы с различной степенью свёртывания листа

Наряду с ионносвязанной формой пероксидазы клеточной стенки важную роль в регуляции эластичных свойств апопласта растительной клетки принадлежит ковалентносвязанной пероксидазе (Сарсенбаев и др., 1983). В результате изучения зонального распределения ковалентносвязанной формы пероксидазы у родительского сорта Омская-9 выявлено, что, как и в случае с ионносвязанной пероксидазой, активность ковалентносвязанного фермента равномерно распределена по листовой пластинке (рис. 7). Пик активности ковалентносвязанной пероксидазы обнаружен у сорта Отан в зонах 3-5. У сорта Альба активность ковалентносвязанной пероксидазы представлена несколькими пиками в зонах 5,8,10, соответствующих 7,5 см, 12 и 15 см листовой пластинки.

Установленные нами генотипические различия в активности и зональном распределении ионно- и ковалентносвязанной пероксидазы клеточной стенки флаговых листьев указывают на вероятное участие апопластных форм фермен-

та в качестве биохимических агентов, регулирующих изменение эластичных свойств клеточной стенки, и обуславливающих феномен свёртывания листа в ответ на засуху.

В процессе температурной адаптации могут изменяться такие характеристики ферментов, как температурный коэффициент (Q_{10}), термостабильность и другие (Хочачка, Сомеро, 1977; Александров, 1985). Критерием термостабильности форм пероксидазы клеточной стенки, выделенных из различных зон листовой пластинки, служила активность, определяемая после 2-часового прогрева ферментных препаратов при температуре 35°C, 45°C, 55°C и 65°C. Контролем служила активность фермента, не подвергнутого тепловой обработке (4°C).

На рис. 8 и 9 представлены результаты, полученные при изучении термостабильности фермента после прогрева при 45°C и 55°C. Степень падения активности ионносвязанной пероксидазы, выделенной из различных зон листовой пластинки, при 45°C нагреве ферментных препаратов была выше у родительского сорта Омская-9 по сравнению с генотипами, имеющими признак свёртывания листа (рис. 8).

Обозначения кривых: Омс 45°C (1); Альба – (2); Отан - (3) 55°C

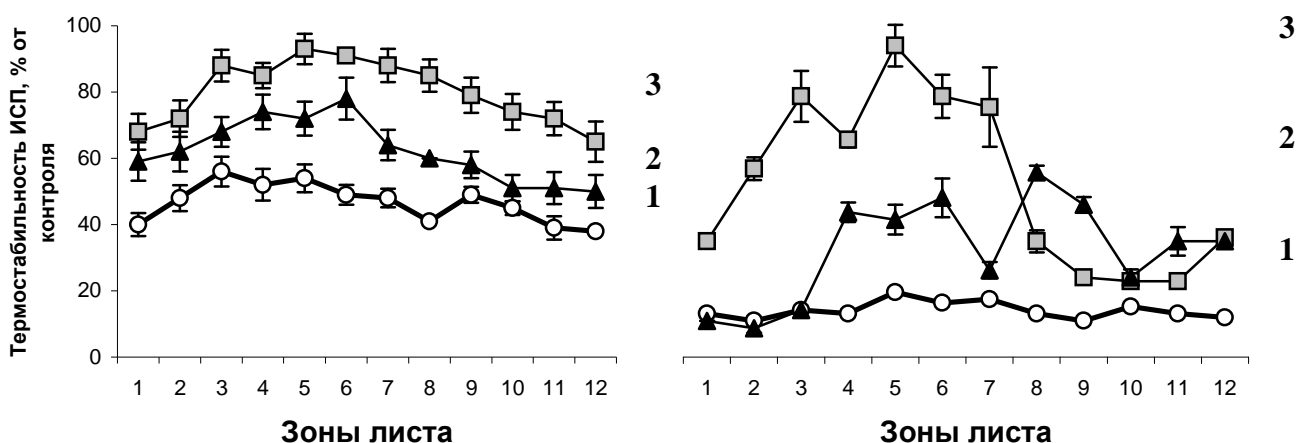


Рис. 8. Термостабильность ионносвязанной пероксидазы флаговых листьев сортов пшеницы, различающихся по степени свёртывания листа при температурах 45°C и 55°C

Установлено, что апопластные формы пероксидазы, выделенные из отдельных зон флаговых листьев генотипов пшеницы со свёрнутыми листьями Отан и Альба, различаются по термостабильности. Термостабильность этой формы пероксидазы клеточной стенки при 45°C варьировала в зависимости от зоны выделения фермента: пероксидаза, выделенная из 3-9 зон листовой пластинки, оказалась наиболее устойчивой у сорта Отан и несколько меньшей у сорта Альба (зоны 3-7).

Интересно отметить, что относительно высокая термостабильность ионносвязанной пероксидазы у сортов Отан и Альба в листовых зонах 3-9 и 3-6, соответственно, совпадает с их высокой активностью, установленной при опре-

делении зонального распределения и феноменом признака свёртывания листа (рис. 7).

Анализ данных по измерению термостабильности ионносвязанной пероксидазы при 55°C, показывает, что тепловая инактивация при этой температуре существенно зависит от зоны локализации фермента и генотипических особенностей (рис.8). В листовых зонах 1-3 у сорта Альба и 8-12 у сорта Отан, имеющих признак свёртывания, нагрев ферментных препаратов при 55°C резко снижал активность фермента. В других сегментах листа (4-6, 8-9 у сорта Альба и 2-7 сорта Отан) нагрев ферментных препаратов при 55°C мало влиял на активность ионносвязанной пероксидазы, что свидетельствует о её высокой термостабильности. Степень падения активности фермента после нагрева при 55°C была наибольшей у родительского сорта Омская-9 и мало зависела от зоны листовой пластинки.

Результаты, полученные при определении термостабильности, свидетельствуют, что ионносвязанная пероксидаза клеточной стенки в различных зонах листа у сортов Отан и Альба представлена неодинаковыми по своим свойствам изоферментами, которые по-разному реагируют на температурный фактор. Генотипические различия по зональной термостабильности ионносвязанной пероксидазы обеспечивают способность фермента эффективно функционировать при действии высокой температуры и свидетельствуют о физиологической роли ионносвязанной пероксидазы в свёртывании листа. Эти различия могут быть обусловлены экспрессией генов и физико-химическими свойствами изоферментов: уровнем гликозилирования, аминокислотным составом (Wälti et al., 2002).

Несколько иная картина была получена при изучении термостабильности ковалентносвязанной пероксидазы клеточной стенки (рис. 9).

Обозначения кривых: Омская-9 – (1); Альба - (2); Отан – (3)

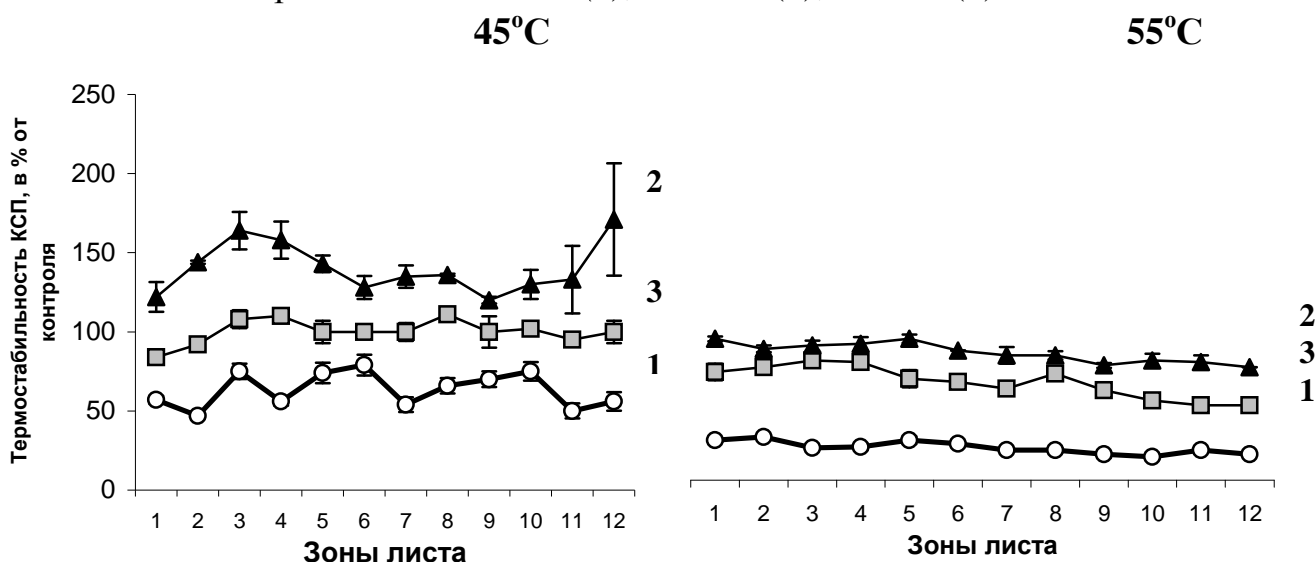


Рис. 9. Термостабильность ковалентносвязанной пероксидазы флаговых листьев сортов пшеницы, различающихся по степени свёртывания листа, при температурах 45°C и 55°C

Степень падения активности ковалентносвязанной пероксидазы при 45°C и 55°C нагреве была наибольшей у родительского сорта Омская-9 вне зависимости от зоны её выделения (рис. 9). Интересно отметить, что при 45°C ковалентносвязанная форма фермента, выделенная из листьев сортов Отан и Альба, оказалась более стабильной по сравнению с ионносвязанной. Нагрев ферментных препаратов, полученных из 2-5 зон листовой пластинки сорта Альба и 3-4 зон сорта Отан, при 45°C повышал активность этой формы пероксидазы соответственно на 40 и 16% (рис. 9). Можно полагать, что увеличение активности обусловлено изменением физико-химических свойств фермента при нагреве и может вносить определённый вклад в изменение механических свойств клеточных стенок.

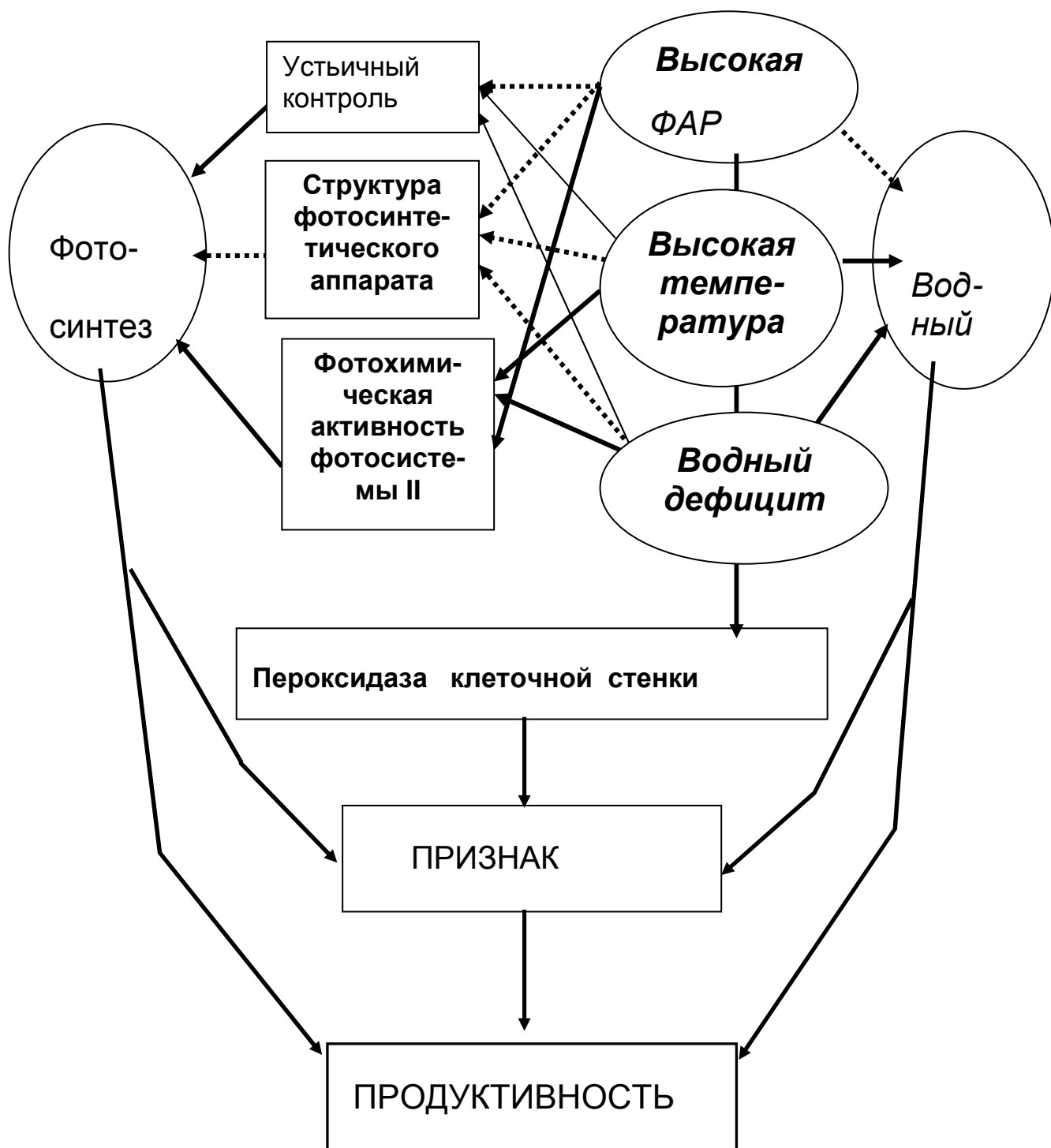
Сравнение термостабильности ковалентносвязанной пероксидазы клеточной стенки при 45 и 55 °C нагреве ферментных препаратов показывает, что тепловая инактивация фермента при 55 °C происходит значительно быстрее, чем таковая при 45 °C (рис. 9). Зональные различия по термостабильности у сортов пшеницы Отан и Альба, различающихся по степени свёртывания, при 55 °C нивелировались.

Итак, для сортов пшеницы, имеющих признак свёртывания листа (Отан и Альба) характерна высокая активность ионно- и ковалентносвязанной пероксидазы в зонах 2-9, соответствующих 3-13,5 см длины листовой пластинки, совпадающая с наибольшим проявлением этого признака. Генотип-обусловленные различия в активности апопластных форм пероксидазы сопряжены с изменениями в термостабильности фермента. Апопластные формы пероксидазы в соответствующих зонах листа у сортов Отан и Альба характеризуются высокой термостабильностью в интервале температур 45°C - 55°C. Степень падения активности этих форм пероксидазы значительно выше у сорта Омская-9, не имеющего этот признак, и не зависит от зоны локализации фермента в листовой пластинке.

Можно заключить, что индуцируемое полевой засухой повышение активности ионно- и ковалентносвязанной форм пероксидазы клеточной стенки в листовых зонах генотипов пшеницы с введённым признаком свёртывания листа сопровождается изменением их термостабильности. Это свидетельствует о существовании множественных форм фермента, характеризующихся различными физико-химическими свойствами, которые могут выполнять различные физиологические функции, в частности, оказывать влияние на свёртывание листа посредством изменения эластичных свойств клеточной стенки.

Таким образом, при засухе у сортов яровой пшеницы с введённым морфологическим признаком «свёрнутый лист» происходят адаптационные физиолого-биохимические изменения в процессах водного обмена, фотосинтеза и функционировании апопластных форм пероксидазы, которые суммированы нами в схеме (рис. 10). Основным фактором, регулирующим процесс фотосинтеза у пшеницы в условиях высокой интенсивности света, высокой температуры и водного дефицита, является фотохимическая активность фотосистемы II на уровне реакционных центров, антенных комплексов и транспорта электронов. Снижение транспирации воды посредством устьичного контроля также вносит

положительный вклад в стабильное функционирование фотосинтетического аппарата в листьях, характеризующихся свёртыванием, при действии засухи.



Обозначения:➔ нет изменений; —➔ усиление; —➔ ингибирование

Рис. 10. Схема адапционных физиолого-биохимических изменений у пшеницы с введённым признаком «свёрнутый лист» при действии различных составляющих засухи (высокая интенсивность света, высокая температура, водный дефицит)

Высокая адаптивная значимость признака «свёрнутый лист» в устойчивости к световому стрессору, температуре и водному дефициту выявляется сравнительным анализом адаптационного потенциала фотосинтетического аппарата сортов пшеницы. Сорт Отан (наибольшая степень свёртывания) характеризуется высоким адаптационным потенциалом фотосинтетического аппарата к действию светового стрессора, температуры 40°C и водного дефицита. Для сорта Альба (средняя степень свёртывания) выявлен высокий адаптационный потенциал к влиянию водного дефицита и светового стрессора.

Изучение физиологической роли апопластных форм пероксидазы в свёртывании листа показывает, что этот феномен связан с изменением эластичных свойств клеточной стенки. Установленные закономерности вносят существенный вклад в современные представления о физиолого-биохимических механизмах устойчивости пшеницы к действию засухи.

Таким образом, физиологическая роль признака свёртывания листа заключается в повышении эффективности водного обмена и снижении негативного действия высокой интенсивности света, температуры и водного дефицита - основных составляющих засухи.

ВЫВОДЫ

1. Высокая продуктивность сортов пшеницы с признаком свёртывания листа коррелирует с сохранением биомассы флаговых листьев в период цветения - молочной спелости, характеризующийся нарастанием засухи. Генотипы, имеющие признак свёртывания листа Грекум-476, Отан и Альба, обладают высоким адаптационным потенциалом фотосинтетического аппарата к действию высокой интенсивности света. Световой стрессор не вызывает снижение скорости фотосинтеза у сортов со свёрнутыми листьями, что обусловлено устойчивостью фотосинтетического аппарата к фотоингибированию, что в свою очередь обеспечивается стабильным функционированием фотосистемы II.

2. Впервые показано, что генотипы с наибольшим проявлением свёртывания Грекум-476 и Отан при действии высокой температуры (40°C продолжительностью 2 дня) характеризуются высоким адаптационным потенциалом фотосинтетического аппарата и являются устойчивыми к фотоингибированию фотосинтеза. Основными факторами, обуславливающими устойчивость этих генотипов, являются стабильная структурная организация фотосистемы II (показатели F_v/F_m , F_v/F_o) и её фотохимическая активность (RF_d 690, A_p), а также эффективная устьичная регуляция транспирации воды и снабжения клеток мезофилла углекислотой.

3. Установлены генотипические различия в устойчивости фотосинтетического аппарата к действию водного дефицита. Наиболее устойчивым к действию водного дефицита на уровне фотосинтеза и фотохимической активности фотосистемы II является сорт Альба, характеризуемый средней степенью свёртывания листа. Особенностью генотипов (Грекум-476 и Отан) является снижение скорости фотосинтеза при действии водного де-

фицита на фоне высокой фотохимической активности фотосистемы II. Основным фактором подавления процесса фотосинтеза у данных генотипов является снижение устьичной проводимости и внутриклеточного содержания CO_2 .

4. Впервые экспериментально доказаны адаптивные преимущества признака свёртывания листа при действии основных составляющих засухи: высокой интенсивности света, высокой температуры и водного дефицита. Сорты Отан и Альба (наибольшая и средняя степень свёртывания) обладают высоким потенциалом адаптации фотосинтетического аппарата к действию высокой интенсивности света. Генотипы Отан и Грекум-476 (наибольшая степень проявления признака) характеризуются высоким адаптационным потенциалом к влиянию высокой температуры, а Отан, Грекум-476 и Альба – к действию водного дефицита.

5. Наибольшая активность ионносвязанной и ковалентносвязанной форм пероксидазы клеточной стенки, выявленная в 2-9 зонах, соответствующих 3-13,5 см от основания листовой пластинки, совпадает с наибольшей степенью свёртывания и может свидетельствовать об участии апопластных форм фермента в проявлении признака, обусловленном изменением эластичных свойств клеточной стенки. Высокая активность ионносвязанной и ковалентносвязанной форм пероксидазы клеточной стенки в зонах 2-9 сопряжена с их высокой термостабильностью в интервале температур 45°C - 55°C .

рекомендации к использованию в практике

1. Полученную новую научную информацию о физиолого-биохимических механизмах устойчивости пшеницы к действию различных составляющих засухи рекомендуется использовать при преподавании спецкурсов по физиологии устойчивости растений и экологической физиологии растений в высших учебных заведениях.

2. Выявлены тестовые признаки: скорость нетто-фотосинтеза P_N , скорость уменьшения флуоресценции хлорофилла в области 690 нм (RFd 690), индекс адаптации фотосинтетического аппарата к стрессу Ar, активность пероксидазы клеточной стенки, которые рекомендуется использовать для оценки адаптационного потенциала генотипов в селекционном процессе.

3. Установленные закономерности функционирования фотосинтетического аппарата в зависимости от степени проявления признака «свёрнутый лист» позволяют корректно оценить адаптационные возможности генотипов и могут служить физиологическим обоснованием в селекционно-генетических программах с учётом степени воздействия основных составляющих засухи в конкретной экологической зоне возделывания пшеницы.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Богданова Е.Д., Полимбетова Ф.А., Гостенко К., Сариева Г.Е. Признак свёртывания листа в адаптации к засухе яровой пшеницы // Изв. АН РК, Сер. биол.-мед., 1999, № 5, С. 36-42.
2. Sariyeva G., Kenjebaeva S. Relative water loss and drought tolerance of spring wheat genotypes // Abstracts Book of the Second Balkan Botanical Congress, Istanbul, 2000, 67 P.
3. Sariyeva G., Kenjebaeva S. Changes in carbohydrate status of wheat genotypes associated with leaf rolling response // Proc. Second Balkan Botanical Congress. (SBBC), Istanbul, 2000, P. 391-396.
4. Sariyeva G., Kenjebaeva S. Leaf rolling trait is related to drought tolerance of spring wheat genotypes // Abstracts Book 3th International Crop Science Congress, Hamburg, 2000, 157 P.
5. Сариева Г., Кенжебаева С. Рост и водный статус флаговых листьев сортов пшеницы с введённым признаком «движение листовых пластинок» при засухе // Изв. АН РК, Сер. биол.-мед., 2000, № 6, С. 48-56.
6. Сариева Г.Е. Водный дефицит и накопление углеводов в свёрнутых листьях яровой пшеницы // Мат. 54 Респ. науч. конф. Алматы, 2000, С.107-109.
7. Kochmetova A., Sariyeva G. Relationship between yield stability, drought resistance and physiological parameters in wheat // Proc. 12th Australian Plant Breeding conference, Perth Western Australia, 2002, P. 219-221.
8. Kochmetova A., Sariyeva G. Relationship between yield stability, drought resistance and physiological parameters in wheat // Abstracts Book 12th Australian Plant Breeding conference, Perth Western Australia, 2002, P. 34.
9. Lichtenthaler H.K., Sariyeva G.E., Kenjebaeva S.S., Polimbetova F.A. Differences in photosynthesis to temperature stress in non-rolling and leaf rolling spring wheat genotypes. Abstracts Book 13 FESPP Congress, Creta, 2002, 254 P.
10. Kochmetova A., Sariyeva G., Kenjebaeva S. Yield stability and drought resistance in wheat // Acta Botanica Hungarica, 2003, V. 45, № 1-2, P. 153-161.
11. Kenjebaeva S., Sariyeva G., Polimbetova F., Matsumoto H. Biochemical responses of the tolerance and sensitivity of wheat to aluminium stress // Proc. 1st Central Asian wheat conf., Almaty, 2003, P. 556-557.
12. Сариева Г.Е., Кенжебаева С.С. Влияние света на формирование и функцию фотосинтетического аппарата пшеницы // Вестник КазНУ им. Аль-Фараби, Сер. биол., 2003, № 3(21), С. 36-39.
13. Sariyeva G.E., Kenjebaeva S.S. Ecophysiological approach of peroxidase activity and thermostability of cell-bound forms in wheat leaves of different morphology // Acta Botanica Hungarica, 2003, V.45, №3-4, P. 399-407.
14. Сариева Г.Е., Кенжебаева С.С., Lichtenthaler H.K. Эффекты R1-генов, контролирующих свёртывание листовой пластинки, на устойчивость пшеницы к засухе // Мат. 3 Съезда ВОГИС, Москва, 2004, Т.1, С.266.

ADAPTATIONAL PHYSIOLOGY-BIOCHEMICAL CHANGES OF WHEAT GENOTYPES WITH LEAF ROLLING TRAIT UNDER DROUGHT

03.00.12 – plants physiology and biochemistry

Summary

The objectives of study were the spring wheat genotypes with inserted leaf rolling trait Otan and Alba, the parents genotypes Omskaya-9 (non-rolling) and Grekum-476 (donor of the trait). The genotypes named Otan and Alba were obtained from crossing of non-rolling cv. Omskaya-9 on Grekum-476. Otan have two dominant leaf rolling genes *Rl 1* and *Rl 2* and Alba one of them.

The aim of the present work is to determine a physiology-biochemical role of leaf rolling trait in drought tolerance of wheat.

All measurements were made on flag leaves of wheat in flowering and grain filling stages of plant development. Relative water content and relative water loss were measured according to Jamaux et al. (1997); an intensity of solar irradiation and diurnal changes in leaf rolling degree by Saneoka et al. (1995). The rate of net-photosynthesis, stomatal conductivity, transpiration, water use efficiency and inter-cellular concentration of CO₂ were measured using a CO₂-H₂O- porometer and calculated according to Schmuck (1986). The photochemical activity of photosystem 2 was determined by using of chlorophyll fluorescence kinetic (Fv/Fm, Fv/Fo, rate of fluorescence decrease in 690 nm – RFd 690 and RFd 735 as described by Rinderle (1990); a stress adaptation index Ap was calculated by Strasser et al. (1987). Chlorophyll and relative carotenoids and xanthophylls content were determined. Fluorescence emission spectra were recorded from 400-640 nm using a Perkin Elmer Luminiscence Spectrometer. An ionically bound and covalently bound with cell wall peroxidase extraction was done according to Gamburg et al. (1977). For the measurements of peroxidase thermostability the extracts were heated for 2 h to the following temperatures: 35°, 45°, 55° and 65°C.

All three leaf-rolling wheat genotypes (Grekum-476, Otan and Alba) were found to have a higher yield than the non-rolling wheat variety Omskaya-9 under drought conditions. It was shown that the higher grain productivity of wheat genotypes with inserted leaf rolling trait under drought is close related to their higher flag leaf biomass production.

The genotypes Grekum-476, Otan and Alba having leaf rolling trait show higher adaptation potential of photosynthetic apparatuses to high light stress, known as one of the main damaging components of drought. Kinetic analysis of chlorophyll *a* fluorescence changes showed that the high light dependence of the photosynthesis was

modulated by stable (Grekum-476) and higher (Otan) photochemical activity of photosystem II.

It was established, that the genotypes with most pronounced leaf rolling degree (Grekum-476 and Otan) remain a higher adaptation potential of photosynthesical apparatuses and are more tolerant to the photoinhibitory effect of high temperature stress (40°C for 2 days) as compare to non-rolling (Omskaya-9) wheat genotypes or with slow degree of leaf rolling (Alba). The temperature acclimation of photosynthesis in wheat genotypes with highest degree of leaf rolling strongly depends on the stable photochemical activity of photosystem II and stomatal regulation of the intensity of water transpiration.

Under water deficit conditions the most expressed degree of leaf rolling genotypes Grekum-476 and Otan remain a high photochemical activity of photosystem II and adaptational potential of photosynthesical apparatuses, unless to decrease in the rate of net-photosynthesis. The most tolerant wheat genotype to high temperature stress, as shown by activity of photosynthesic, is the slow leaf rolling genotype Alba.

Thus, the wheat genotypes having leaf rolling trait differ in adaptation potential of photosynthesis to the most dangerous components of drought: high light intensity, heat and water deficit. According to our classification, the genotypes Otan and Alba (high and slow degree of leaf rolling, respectively) are most efficiently acclimated to high light conditions. Genotypes Grekum-476 and Otan (high degree of leaf rolling) have the highest adaptation potential of photosynthesis to the heat stress and all the genotypes with leaf rolling trait are well adapted to the water deficit.

The close relationship between spatial distribution of the ionically and covalently-bound to the cell wall peroxidase forms and leaf rolling is first experimentally proved. It is shown, that an increase in activity of both apoplastic peroxidase forms, extracted from 2-9 zones of flag leaf blade, corresponding to 3-13,5 cm from the leaf base, is accompanied with changes in their thermostability. It may evidence about a presence of many different molecular forms of cell-bound peroxidase, which can display different physiological functions. Adaptive response of cell wall-bound peroxidase displaying in high thermostability in the broad temperature range 35°C - 55°C explain their regulating function as biochemical agent of changes in cell wall elasticity and can determine their function in the mechanism of leaf rolling.

Established features of physiology-biochemical role of leaf rolling trait in improving of drought tolerance are the base for creation of new tolerant genotypes of wheat with inserted adaptive morphophysiological traits.