



УДК 57.044+58.02

ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ХЛОРОФІЛ-БІЛКОВИХ КОМПЛЕКСІВ У ЛИСТКАХ РОСЛИН ЗА ДІЇ ІОНІВ КАДМІЮ ТА САЛІЦИЛАТУ

I. В. Бойко, М. С. Кобилецька, О.І. Терек

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: iryna.boiko@yahoo.com

Досліджено зміни стану хлорофіл-білкових комплексів рослин пшениці та кукурудзи за дії кадмієвого стресу і різних способів обробки саліцилатом. Виявлені модифікації стану пігмент-білкових комплексів свідчать про адаптивну дію саліцилової кислоти на рослини за умов стресу, індукованого іонами Кадмію. Вплив саліцилової кислоти є видоспецифічним і залежить від чутливості виду до дії стресу. Розглянуто особливості впливу досліджуваних сполук на хлорофіли *a* та *b*, а також можливі механізми участі саліцилату в регуляції стану хлорофіл-білкових комплексів у стресових умовах.

Ключові слова: саліцилова кислота, Кадмій, фотосинтез, хлорофіл-білкові комплекси, адаптація, стрес, *Triticum aestivum* L., *Zea mays* L.

ВСТУП

Процес акумуляції сонячної енергії рослинами у вигляді енергії хімічних сполук є чи не найважливішим процесом на Землі. Рослини мають складний і досконалий механізм вловлювання та подальшої трансформації сонячної енергії у вуглеводи, які є джерелом енергії для метаболічних процесів. Продуктивність фотосинтетичного перетворення енергії в кінцевому результаті виражається у нагромадженні біомаси [9]. Фотохімічні етапи фотосинтезу відбуваються за участю пігментів рослин – хлорофілів і каротиноїдів, які мають специфічні хімічні та оптичні властивості. Фотосинтетичні пігменти організовані у вигляді хлорофіл-білкових комплексів (ХБК), розташованих на мембранах тилакоїдів, які забезпечують пігментам необхідне взаєморозташування та відповідну конформацію. Основна функція ХБК полягає у збиранні світла та у первинних фотохімічних реакціях; деякі комплекси виконують функцію розсіювання енергії для запобігання пошкодженню системи при надлишку світла [5]. ХБК поділяють на 3 групи: 1) Chl a -білки, які зв'язують хлорофіл *a* та β -каротин і становлять внутрішню частину комплексів, вони функціонують як реакційні центри та внутрішні/центральні світлозбиральні антени; 2) Chl a/b -білки, які зв'язують хлорофіли *a*, *b* та ксантофіли,

є частиною периферичної світлозбиральної системи або виступають зв'язком між центральними та периферичними світлозбиральними комплексами; 3) Елір-подібні білки (early light-induced proteins), які виконують фотопротекторну функцію через зв'язування вільних (новосинтезованих чи деградованих) хлорофілів або гасіння надлишкової енергії [25]. Також до складу мембран тилакоїдів входять ліпіди (галактоліпіди, фосфатидилгліцероли), які беруть участь у стабілізації ХБК [20]. Синтез ХБК відбувається як у хлоропластах (Chla-білки), так і у цитоплазмі за участю ядерного геному (Chla/b-білки) [22]. Регуляція синтезу ХБК може відбуватися за участю фітохромів (транскрипційний рівень) або шляхом зворотного фосфорилування (посттранскрипційний рівень) [10, 12].

Відомо, що ХБК можуть виступати мішенями за дії стресорів на рослинний організм. Зокрема, встановлено, що за дії осмотичного стресу відбувається дестабілізація ХБК [11]. Процеси синтезу й акумуляції ХБК є чутливими до дії екстремальних температур [13]. При дефіциті Fe^{2+} спостерігали генетично регульовану реорганізацію структури ХБК [15]. Виявлені численні зміни ХБК у фотосистемі II, яка є чутливішою до стресового впливу [21, 27, 28]. Компоненти мембран тилакоїдів також є основною ціллю токсичної дії іонів важких металів (ІВМ), незважаючи на те, що лише незначна їхня кількість (близько 1% вмісту в листках) досягає хлоропластів. Встановлено, що ІВМ мають токсичний вплив на майже всі ланки фотосинтетичних процесів [25] і метаболізму рослини загалом [8, 23].

Саліцилова кислота (СК) є багатофункціональною сполукою, одним із аспектів її функціонування у рослинному організмі є участь у формуванні стійкості до біотичних і абіотичних стресів у ролі сигнальної молекули. Зовнішній вплив СК може мати протекторну дію на рослини за стресових умов. Екзогенна СК має позитивний вплив на ріст, розвиток і функціонування окремих систем рослинного організму за дії стресу [17, 24]. Дослідження вчених показали, що СК має здатність нівелювати токсичний вплив стресорів різного походження на вміст пластидних пігментів і активність ключових ферментів фотосинтезу, підвищуючи інтенсивність цього процесу [19, 26]. Оскільки ХБК можуть виступати мішенню токсичної дії стресора, ми дослідили вплив СК на їхній функціональний стан за дії кадмієвого стресу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктом досліджень обрано рослини пшениці (*Triticum aestivum* L.) сорту Подлянка та кукурудзи (*Zea mays* L.) сорту Закарпатська жовта зубовидна. Рослини вирощували в теплиці у контрольованих умовах методом піщаної культури. Кадмій вносили в субстрат у вигляді $CdCl_2 \cdot 2,5H_2O$ у розрахунок 25 мг/кг піску. Рослини поливали дистильованою водою, підтримуючи вологоємність субстрату 60–70%; двічі на тиждень вносили 25 мл модифікованого поживного розчину Хогланда. Для обробки СК застосовували два методи: допосівне замочування насіння в 0,1 та 0,5 мМ розчинах СК протягом 5 год (контрольне насіння замочували у дистильованій воді) та обприскування 7-добових проростків відповідними розчинами СК (контрольні проростки обробляли дистильованою водою). На 28-му добу росту відбирали проби для аналізу стану ХБК листків досліджуваних рослин.

Функціональний стан ХБК оцінювали за міцністю зв'язку хлорофілів з білками, яку визначали після екстракції пігментів полярними та неполярними розчинниками. 50 мг подрібнених листків розтирали у суміші розчинників (бензин + різні

концентрації етанолу) в присутності безводного натрію сульфїту, міцність зв'язку ХБК визначали за різницею екстрагованого сумішшю розчинників хлорофілу та загальним вмістом пігментів, яку визначали спектрофотометрично за Хольм-Веттштейном [6, 7]. Вміст хлорофілу в світлозбиральних комплексах (СЗК) розраховували за Ліхтентайлером, враховуючи, що весь хлорофіл *b* міститься у СЗК і співвідношення хлорофілів *a/b* у цьому комплексі становить 1,2 [4]. Наведено усереднені результати з 3 незалежних біологічних і 9 аналітичних повторностей.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив стресора на рослини спричинював зміни стану ХБК у листках досліджуваних рослин (рис. 1–2). Виявлено суттєві відмінності між міцністю зв'язку хлорофілу з білково-ліпідним комплексом у рослин пшениці та кукурудзи за стресових умов. Дія іонів кадмію мала негативний вплив на більшість фракцій ХБК листків пшениці, проте деякі фракції виявилися стійкими до впливу стресу. У рослин кукурудзи спостерігалось зростання міцності ХБК щодо контролю, що можна вважати результатом високого адаптивного потенціалу рослин кукурудзи до дії важких металів. Отримані результати узгоджуються з літературними дани-

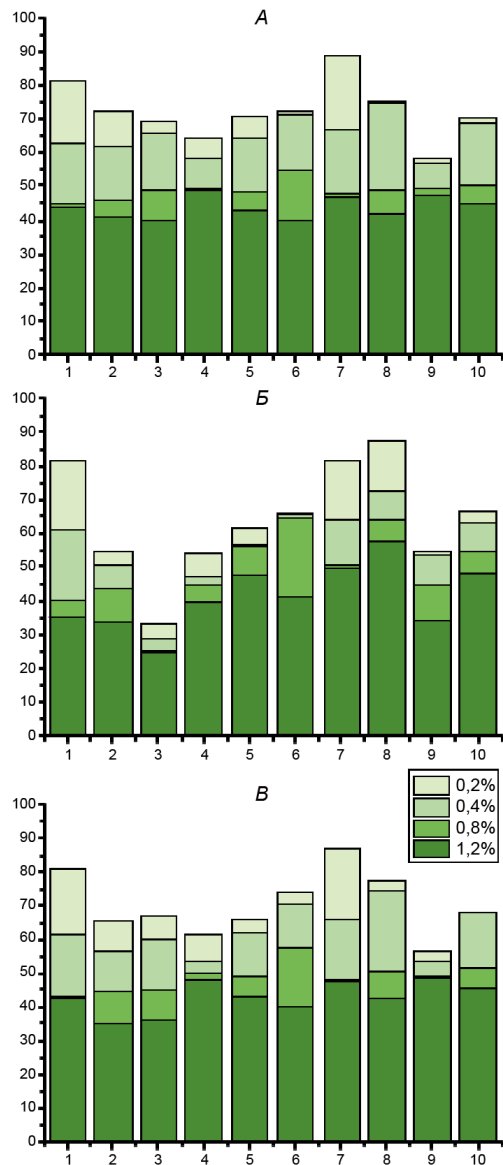
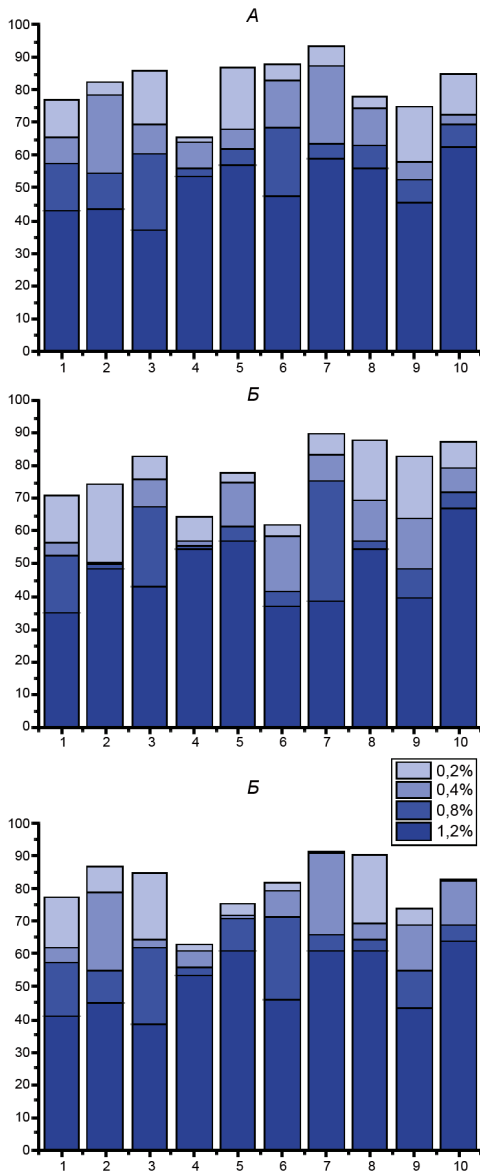


Рис. 1. Міцність зв'язку хлорофілу *a* (А), *b* (Б) та загальна (В) з білково-ліпідним комплексом у листках рослин пшениці за дії іонів Кадмію і саліцилату, % невилученого хлорофілу:

1 – контроль; 2 – СК 0,1 мМ (замочування); 3 – СК 0,1 мМ (обприскування); 4 – СК 0,5 мМ (замочування); 5 – СК 0,5 мМ (обприскування); 6 – Cd²⁺; 7 – Cd²⁺ + СК 0,1 мМ (замочування); 8 – Cd²⁺ + СК 0,1 мМ (обприскування); 9 – Cd²⁺ + СК 0,5 мМ (замочування); 10 – Cd²⁺ + СК 0,5 мМ (обприскування)

Fig. 1. Connection strength of chlorophyll *a* (A), *b* (B) and total (B) with protein-lipid complex in wheat leaves affected by cadmium ions and salicylate, % of non-separated chlorophyll:

1 – control; 2 – SA 0.1 mM (soaking); 3 – SA 0.1 mM (spraying); 4 – SA 0.5 mM (soaking); 5 – SA 0.5 mM (spraying); 6 – Cd²⁺; 7 – Cd²⁺ + SA 0.1 mM (soaking); 8 – Cd²⁺ + SA 0.1 mM (spraying); 9 – Cd²⁺ + SA 0.5 mM (soaking); 10 – Cd²⁺ + SA 0.5 mM (spraying)



ми, які свідчать про зростання міцності зв'язку ХБК за дії іонів важких металів у толерантних видів та зниження у чутливих [1]. Відомо, що існують генетично детерміновані відмінності у процесах синтезу й акумуляції ХБК у рослин пшениці та кукурудзи [14]. Також вченими доведено, що структура ХБК значно відрізняється залежно від чутливості виду рослин до стресора [16]. Дослідження показали, що зв'язок хлорофілу *b* з мембранами тилакоїдів є чутливішим до дії важких металів (рис. 1–2).

Екзогенна СК мала певний вплив на організацію пігмент-білкових комплексів. Обробка рослин/насілля пшениці СК вела до диференційованого впливу на ХБК: слабші (екстраговані сумішшю розчинників з низьким вмістом C_2H_5OH) піддавалися негативному впливу іонів Кадмію, а міцніші (екстраговані сумішшю розчинників з високим вмістом C_2H_5OH) зазнали позитивних змін. Молекули хлорофілу *b* виявили більшу мінливість зв'язку з ліпопротеїдами мембран тилакоїдів. У ході експериментів нами не було виявлено зв'язку між концентрацією та способом обробки СК і станом ХБК пшениці. Проте за дії СК зростала міцність зв'язку ХБК кукурудзи. Цей вплив був виразнішим при обприскуванні рослин СК, проте ми не виявили кореляції між даним явищем і зростанням концентрації СК (рис. 1–2). Це може бути пов'язано з безпосереднім впливом СК на структури листка при обробці рослин шляхом обприскування.

Рис. 2. Міцність зв'язку хлорофілу *a* (А), *b* (Б) та загальна (Б) з білково-ліпідним комплексом у листках рослин кукурудзи за дії іонів кадмію і саліцилату, % невилученого хлорофілу:

1 – контроль; 2 – СК 0,1 мМ (замочування); 3 – СК 0,1 мМ (обприскування); 4 – СК 0,5 мМ (замочування); 5 – СК 0,5 мМ (обприскування); 6 – Cd^{2+} ; 7 – Cd^{2+} + СК 0,1 мМ (замочування); 8 – Cd^{2+} + СК 0,1 мМ (обприскування); 9 – Cd^{2+} + СК 0,5 мМ (замочування); 10 – Cd^{2+} + СК 0,5 мМ (обприскування)

Fig. 2. Connection strength of chlorophyll *a* (A), *b* (Б) and total (Б) with protein-lipid complex in maize leaves effected by cadmium ions and salicylate, % of non-separated chlorophyll:

1 – control; 2 – SA 0.1 mM (soaking); 3 – SA 0.1 mM (spraying); 4 – SA 0.5 mM (soaking); 5 – SA 0.5 mM (spraying); 6 – Cd^{2+} ; 7 – Cd^{2+} + SA 0.1 mM (soaking); 8 – Cd^{2+} + SA 0.1 mM (spraying); 9 – Cd^{2+} + SA 0.5 mM (soaking); 10 – Cd^{2+} + SA 0.5 mM (spraying)

При дії СК на рослини пшениці за умов кадмієвого стресу виявлено посилення зв'язку міцнішої фракції ХБК, що можна вважати проявом адаптивної дії СК. Проте ми не спостерігали залежності впливу СК від варіанта обробки нею рослин. Дані дослідження свідчать, що СК має позитивний вплив на ХБК листків кукурудзи за дії іонів кадмію; цей ефект був особливо виражений щодо хлорофілу *b*. Не виявлено змін щодо контролю у варіанті з рослинами кукурудзи, оброблених 0,5 мМ СК шляхом допосівного замочування насіння та вирощених на субстраті з вмістом іонів Кадмію. Нами раніше виявлено, що саме цей варіант обробки СК рослин кукурудзи має значний позитивний вплив на ростові параметри та вміст пластидних пігментів [2, 3], тому можна припустити, що у даному випадку відбулася виражена адаптація рослинного організму до дії стресу.

Наші дослідження виявили також структурні зміни фотосинтезувального апарату в різних варіантах вирощування рослин. За дії йонів Кадмію спостерігався перерозподіл хлорофілу в фотосистемах: вміст хлорофілу в світлозбиральних комплексах (СЗК) рослин пшениці зменшувався, у кукурудзи виявлено певне збільшення частки хлорофілу в СЗК. За дії стресора та СК в обох рослин відбувалося зростання кількості хлорофілу в СЗК та одночасне зменшення його частки. Самостійний вплив СК мав різну дію на хлорофіли СЗК досліджуваних рослин – виявлено зниження його вмісту і відсоткового співвідношення у пшениці та зростання даного показника у кукурудзи (рис. 3).

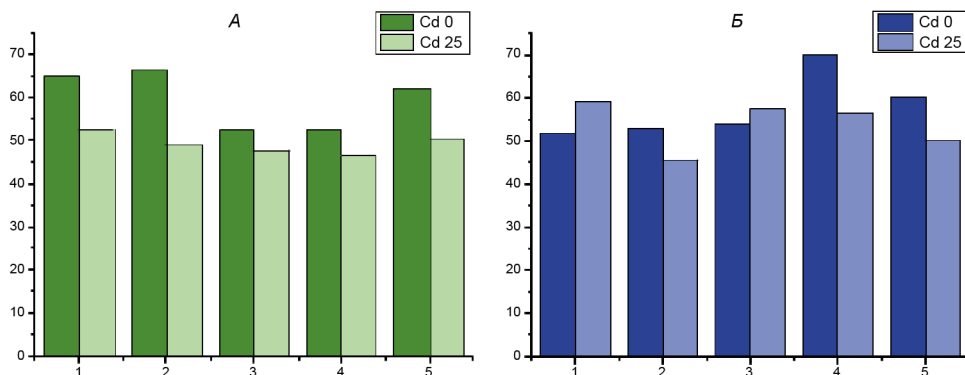


Рис. 3. Частка хлорофілів у СЗК рослин пшениці (А) та кукурудзи (Б) за дії іонів Кадмію та саліцилату, % загального вмісту хлорофілу:

1 – контроль; 2 – СК 0,1 мМ (замочування); 3 – СК 0,1 мМ (обприскування); 4 – СК 0,5 мМ (замочування); 5 – СК 0,5 мМ (обприскування)

Fig. 3. Part of chlorophylls of LHC in wheat (A) and maize (B) plants affected by cadmium ions and salicylate, % of total chlorophyll:

1 – control; 2 – SA 0,1 mM (soaking); 3 – SA 0.1 mM (spraying); 4 – SA 0.5 mM (soaking); 5 – SA 0.5 mM (spraying)

Описані модифікації стану ХБК у листках пшениці та кукурудзи за дії йонів Кадмію та СК свідчать про те, що СК має здатність впливати на організацію пігмент-білкових комплексів, цей вплив є видоспецифічним і залежить від чутливості виду до дії стресу, та не має чіткої залежності від способу й концентрації обробки СК.

Високий ступінь мінливості зв'язку хлорофілу *b* з ліпопротеїдами мембран тилакоїдів, очевидно, є результатом ролі даного пігменту в ХБК, яка полягає у сприяттні правильному розміщенню хлорофілу *a* та білків [18]. Механізми впливу СК на ХБК за стресових і нестресових умов можуть полягати у регуляції активності ферментів метаболізму хлорофілу чи зниженні інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів, які мають модифікувальний вплив на стан ХБК [29].

1. Бессонова В.П. **Влияние тяжелых металлов на фотосинтез растений.** Днепропетровск: ДнГАУ, 2006. 208 с.
2. Бойко І.В., Кобилецька М.С., Терек О.І. Особливості впливу саліцилату на ростові параметри та вміст хлорофілів у рослин пшениці за дії кадмію хлориду. В кн.: **Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів.** Матер. XI конф. мол. вч. м. Київ, 22–24 червня 2010 р. Київ, 2010: 25–27.
3. Бойко І.В., Кобилецька М.С. Стан пігментної системи рослин *Zea mays* L. за дії хлориду кадмію та саліцилової кислоти. В кн.: **Біологія: від молекули до біосфери.** Матер. V міжнар. конф. мол. науковц. м. Харків, 22–25 листопада 2010 р. Харків, 2010: 254–256.
4. Дьмова О.В., Гриб І., Головка Т.К. и др. Состояние пигментного аппарата зимне- и летнезеленых листьев теневыносливого растения *Ajuga reptans*. **Физиология растений**, 2010; 57(6): 809–818.
5. Кочубей С.М. **Организация фотосинтетического аппарата высших растений.** Киев: Альтерпрес, 2001. 204 с.
6. Мусієнко М.М., Паршикова Т.В., Славний П.С. **Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин.** Київ: Фітосоціоцентр, 2001. 200 с.
7. Починок Х.Н. **Методы биохимического анализа растений.** Киев: Наукова думка, 1976. 336 с.
8. Терек О.І. Механізми адаптації та стійкості рослин до несприятливих факторів довкілля. **Журнал агробіології та екології**, 2004; 1(1–2): 41–56.
9. Amthor J.S. From sunlight to phytomass: on the potential efficiency of converting solar radiation to phyto-energy. **New Phytol**, 2010; 188: 939–959.
10. Bennett J. Regulation of photosynthesis by reversible phosphorylation of the light-harvesting chlorophyll *a/b* protein. **Biochem J**, 1983; 212: 1–13.
11. Besford R.T., Richardson C.M., Campos J.L. et al. Effect of polyamines on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves. **Planta**, 1993; 189: 201–206.
12. Bradburne J.A., Kasperbauer M.J., Mathis J.M. Reflected far-red light effects on chlorophyll and light-harvesting chlorophyll protein (LHC-I) contents under field conditions. **Plant Physiol**, 1989; 91: 800–803.
13. Burke J.J., Oliver M.J. Optimal thermal environments for plant metabolic processes (*Cucumis sativus* L.). **Plant Physiol**, 1993; 102: 295–302.
14. Burkey K.O. Chlorophyll-protein complex composition during chloroplast development: A species comparison. **Photosynth. Res**, 1987; 11: 211–224.
15. Burnap R.L., Troyan T., Sherman L.A. The highly abundant chlorophyll-protein complex of iron-deficient *Synechococcus* sp. PCC7942 (CP43') is encoded by the *isiA* gene. **Plant Physiol**, 1993; 103: 893–902.
16. Garstka M., Venema J.H., Rumak I. et al. Contrasting effect of dark-chilling on chloroplast structure and arrangement of chlorophyll–protein complexes in pea and tomato: plants with a different susceptibility to non-freezing temperature. **Planta**, 2007; 226: 1165–1181.
17. Hayat Q., Hayat S., Irfan M. et al. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. **Environ. Exp. Bot**, 2010; 68: 14–25.

18. Hooper J.K., Eggink L.L., Chen M. Chlorophylls, ligands and assembly of light-harvesting complexes in chloroplasts. **Photosynth. Res.**, 2007; 94: 387–400.
19. Krantev A., Yordanova R., Janda T. et al. Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. **J. Plant. Physiol.**, 2008; 165: 920–931.
20. Krupa Z. The action of lipases on chloroplast membranes. III. The effect of lipid hydrolysis on chlorophyll-protein complexes in thylakoid membranes. **Photosynth. Res.**, 1984; 5: 177–184.
21. Meyer S., de Kouchkovsky Y. Electron transport, Photosystem-2 reaction centers and chlorophyll-protein complexes of thylakoids of drought resistant and sensitive Lupin plants. **Photosynth. Res.**, 1993; 37: 49–60.
22. Nechushtai R., Cohen Y., Chitnis P.R. Assembly of the chlorophyll-protein complexes. **Photosynth. Res.**, 1995; 44: 165–181.
23. Pahlsson A.-M.B. Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. **Water, Air and Soil Pollut.**, 1989; 47: 287–319.
24. Popova L., Pancheva T., Uzunova A. Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiological role. **Bulg. J. Plant Physiol.**, 1997; 23(1–2): 85–93.
25. Sarvari E. Effects of heavy metals on chlorophyll-protein complexes in higher plants: causes and consequences. In: **Handbook of Photosynthesis**, ed. M. Pessarakli. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005; 865–888.
26. Shi G.R., Cai Q.S., Liu Q.Q. et al. Salicylic acid-mediated alleviation of cadmium toxicity in hemp plants in relation to cadmium uptake, photosynthesis, and antioxidant enzymes. **Acta Physiol Plant.**, 2009; 31: 969–977.
27. Siffel P., Braunov Z. Release and aggregation of the light-harvesting complex in intact leaves subjected to strong CO₂ deficit. **Photosynth. Res.**, 1999; 61: 217–226.
28. Walters R.G., Horton P. Structural and functional heterogeneity in the major light-harvesting complexes of higher plants. **Photosynth. Res.**, 1999; 61: 77–89.
29. Yamauchi Y., Sugimoto Y. Effect of protein modification by malondialdehyde on the interaction between the oxygen-evolving complex 33 kDa protein and photosystem II core proteins. **Planta**, 2010; 231: 1077–1088.

FUNCTIONAL STATUS OF CHLOROPHYLL-PROTEIN COMPLEXES IN LEAVES OF PLANTS INFLUENCED BY CADMIUM IONS AND SALICYLATE

I. V. Boiko, M. S. Kobyletska, O. I. Terek

*Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: iryna.boiko@yahoo.com*

Changes in status of chlorophyll-protein complexes of wheat and maize plants influenced by cadmium stress and different treatments with salicylate were studied. Observed modifications of pigment-protein complexes indicate adaptive effect of salicylic acid on cadmium-stressed plants. Impact of salicylic acid is species-specific and depends on stress sensitivity of plant. Features of salicylate and cadmium influence towards chlorophyll *a* and *b*, and possible mechanisms of salicylate role in regulation of status of chlorophyll-protein complexes under stressful conditions, are considered.

Key words: salicylic acid, cadmium, photosynthesis, chlorophyll-protein complexes, adaptation, stress, *Triticum aestivum* L., *Zea mays* L.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ХЛОРОФИЛЛ-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ В ЛИСТЯХ РАСТЕНИЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ ИОНОВ КАДМИЯ И САЛИЦИЛАТА

И. В. Бойко, М. С. Кобылецька, О. І. Терек

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: iryna.boiko@yahoo.com*

Исследованы изменения состояния хлорофилл-белковых комплексов растений пшеницы и кукурузы под влиянием кадмиевого стресса и различных способов обработки салицилатом. Обнаруженные модификации состояния пигмент-белковых комплексов свидетельствуют об адаптивном действии салициловой кислоты на растения в условиях стресса, индуцированного ионами Кадмия. Влияние салициловой кислоты является видоспецифическим и зависит от чувствительности вида к воздействию стресса. Рассмотрены особенности влияния исследуемых соединений на хлорофиллы *a* и *b*, а также возможные механизмы участия салицилата в регуляции состояния хлорофилл-белковых комплексов в стрессовых условиях.

Ключевые слова: салициловая кислота, Кадмий, фотосинтез, хлорофилл-белковые комплексы, адаптация, стресс, *Triticum aestivum* L., *Zea mays* L.

Одержано: 15.03.2011