

## ВЛИЯНИЕ ИМИТИРОВАННОЙ МИКРОГРАВИТАЦИИ НА ФОРМИРОВАНИЕ ПИГМЕНТНОГО АППАРАТА В ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКАХ ЯЧМЕНЯ

© 2017 г. Е.Б. Онойко, В.В. Подорванов, С.К. Сытник\*, А.А. Сиваш

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, 01601, Киев, ул. Терещенковская, 2, Украина

E-mail: membrana@ukr.net

\*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, 03022, Киев, ул. Васильковская, 31/17, Украина

E-mail: shotarustav@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.08.16 г.

После доработки 27.02.17 г.

Изучено влияние горизонтального клиностатирования на динамику накопления основных фотосинтетических пигментов в ходе зеленения 6-дневных этиолированных проростков ячменя. Содержание протохлорофиллида – непосредственного предшественника хлорофилла *a* – в клиностатированных проростках в темноте было на 9–20% ниже, чем в контроле. Накопление хлорофилла после 12 ч освещения проростков в условиях клиностатирования отставало от контроля на 45%, но через 48–72 ч приближалось к контрольному уровню. Общее содержание каротиноидов многократно возрастало при зеленении, причем на первом этапе в клиностатированных проростках было меньшим, чем в контроле. Синтез  $\delta$ -аминолевулиновой кислоты и активность  $\delta$ -аминолевулинат дегидратазы в клиностатированных проростках после 24 ч зеленения уступали, а через 72 ч приближались к контрольным значениям. Активность Mg-протопорфирин IX хелатазы, катализирующей включение иона Mg в структуру хлорофилла *a*, не изменялась при клиностатировании. Полученные результаты свидетельствуют о торможении начальных этапов биосинтеза хлорофилла в условиях имитированной микрогравитации. Свет в определенной степени уменьшает негативное влияние микрогравитации на формирование фотосинтетического аппарата в растениях.

*Ключевые слова:* гравитропизм, биосинтез хлорофилла, фотосинтез, этиолированные растения, фототропизм, *Hordeum vulgare* L.

Ориентация растений в пространстве определяется внешними сигналами, в основном направлением гравитационного и светового векторов. Восприятие изменений гравитационного поля обеспечивается очень чувствительными механизмами, регулирующими протекание метаболических процессов, деление и дифференциацию клеток и процессы репродукции растений [1,2]. В невесомости решающее влияние на рост растений оказывают так называемые непрямые эффекты микрогравитации [3,4], такие как пониженная циркуляция воздуха и отсутствие тепловой конвекции, затрудняющие газообмен и корневое питание. При надлежащем контроле параметров окружающей среды, включая температуру, влажность, освещение, доставку питательных веществ и состав воздуха,

эти эффекты могут быть преодолены. И, как показали результаты российских [5] и американских [6] орбитальных экспериментов, а также исследований, выполненных на борту международной космической станции [7,8], в условиях космического полета возможны рост и развитие высших растений в ряде последовательных поколений в течение полного цикла онтогенеза от семени до семени. Вместе с тем у растений, выращенных в космосе, наблюдались морфофизиологические изменения, проявлялись многочисленные признаки умеренного физиологического стресса [1,9] и ускоренного старения [10,11].

В условиях микрогравитации в клетках растений нарушалась ультраструктура и морфология хлоропластов, уменьшалось их количество, снижались число тилакоидов в гранах и степень стэкинга гранальных тилакоидов [10]. Однако в космических экспериментах с усиленной вентилиацией у *Arabidopsis thaliana* не было зафиксировано значительных отличий в ультраструк-

Сокращения: ФС I – фотосистема I, ФС II – фотосистема II, Хл – хлорофилл, ФСА – фотосинтетический аппарат, АЛК –  $\delta$ -аминолевулиновая кислота, АЛКД –  $\delta$ -аминолевулинат дегидратаза, ПХд – протохлорофиллид.

туре хлоропластов полетных и наземных растений [6,13].

При исследовании влияния микрогравитации на фотохимическую активность хлоропластов *Brassica rapa* были установлены существенные различия в активности фотосистем I и II (ФС I и ФС II) [6]. Хотя рост растений *B. rapa* в космосе не отличался от контрольной группы в аналогичных условиях на Земле, соотношение хлорофиллов (Хл) Хл *a*/Хл *b* в полете было более высоким, на 30% уменьшалось количество комплексов ФС I при соответствующем снижении фотохимической активности, тогда как количество комплексов и активность ФС II несущественно отличались от наземного контроля. Снижение активности фотосистем было зарегистрировано также в полетных [13, 14] и в наземных экспериментах, эффекты микрогравитации в которых моделировали при выращивании растений риса в 3D-клиноstate [15] и растений гороха в 2D-клиноstate [16]. При 3D-клиноstate-тировании, как недавно было показано [17], подавлялась экспрессия 34 белков, имеющих отношение к фотосинтезу, а экспрессия четырех полипептидов, связанных с фотосинтезом, возрастала. В частности, значительно подавлялась экспрессия компонентов ФС I. Было отмечено также, что, несмотря на изменение уровня экспрессии некоторых полипептидов, 3D-клиноstate-тирование не оказывало существенного влияния на активность ФС II [17]. Эти результаты указывают на то, что при адаптации растений к изменению гравитационного сигнала участвуют не только стрессовые белки [18], но и компоненты фотосинтетического аппарата (ФСА).

Влияние микрогравитации на пигментный состав ФСА изучался в нескольких орбитальных и наземных экспериментах, результаты которых во многом противоречат друг другу. В работах [5,7,8] не было обнаружено значимых различий в количестве пигментов у полетных и наземных растений. У гороха [19] и проростков 10-дневной карликовой пшеницы [20], выращенных на борту космических станций, было отмечено увеличение концентрации Хл на 15–20%. Содержание Хл в проростках риса после пяти суток клиноstate-тирования превышало вертикальный контроль более чем в два раза [21]. Уменьшение количества Хл при выращивании растений в космосе регистрировалось в листьях гороха [22] и кукурузы [9], а также при клиноstate-тировании проростков гороха [12,23]. Было отмечено также уменьшение количества ацилсодержащих мембранных липидов [9,23], полиненасыщенных жирных кислот и индивидуальных каротиноидов [9].

Противоречивые данные об эффектах микрогравитации, полученные в космических экспедициях, обычно проверяют в модельных наземных экспериментах [24]. Однако неоднозначные результаты клиноstate-тирования [1,2,12,21, 23] не дают оснований для ответа на вопрос, влияют ли изменения гравитационного поля на процесс фотосинтеза и, в частности, на биосинтез и накопление фотосинтетических пигментов.

Целью настоящей работы было изучение влияния имитированной микрогравитации на формирование пигментного аппарата в ходе зеленения этиолированных проростков ячменя.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Семена ячменя (сорт Вакула) стерилизовали в 2%-м растворе гипохлорита натрия (NaOCl) в течение 20 мин, промывали дистиллированной водой и размещали по одному в пробирки, заполненные базальтовым волокном, увлажненным питательным раствором Хогланда, разбавленным водой в соотношении 1 : 1 с добавлением питательного раствора «Вермистим» (Украина). Пробирки с контрольными образцами оставляли в вертикальном положении, а опытные проростки горизонтально размещали в кассете клиноstate, медленно вращающейся при постоянной скорости (4 об/мин). Растения проращивали в течение шести суток в темноте при температуре  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  и 60% влажности, увлажняя субстрат дважды в сутки. Начиная с седьмых суток, обеспечивали равномерное освещение проростков люминесцентными лампами с плотностью потока фотонов на уровне растений  $90\text{--}120 \text{ мкмоль}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ , которую оценивали с помощью сферического микроквантового сенсора US-SQS и измерительного устройства LI-250 (LI-COR, США).

**Определение содержания пигментов.** Пигменты экстрагировали ацетоном с добавлением безводного  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  [25]. Разделение экстрактов проводили методом тонкослойной хроматографии с использованием алюминиевых пластинок со слоем силикагеля 0,2 мм (Sigma-Aldrich, Германия). Для разделения каротиноидов использовали смесь гексана и этанола (16 : 1 по объему). Пигментные полосы снимали и экстрагировали этанолом (лютеин, виолаксантин, неоксантин), 100%-м ацетоном ( $\beta$ -каротин, хлорофилл) и 80%-м ацетоном (протохлорофиллид). Содержание пигментов определяли спектрофотометрическим методом в трех повторениях, рассчитывая по соответствующим формулам для высших растений [26].

**Определение содержания  $\delta$ -аминолевулиновой кислоты** выполняли согласно методикам,

опубликованным в работах [27,29]. Использовали срезанные листья зеленеющих проростков, количество  $\delta$ -аминолевулиновой кислоты (АЛК) в которых оценивали сразу (нулевой момент времени) и после обработки леулиновой кислотой при освещении ( $100 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ) в течение 4 ч. 200 мг листьев каждого варианта инкубировали в 0,1 М буферном растворе трис-HCl (pH 6,5), содержащем 0,06 М леулиновой кислоты, и растирали в охлажденной ступке в 5 мл 1 М ацетатного буфера. Водную фазу отделяли центрифугированием при 10000 g, отбирали 1 мл супернатанта, добавляли 4 мл воды и 250 мкл ацетилацетона, после чего смесь нагревали в течение 15 мин при  $100^\circ\text{C}$ . Охлажденный раствор смешивали с равным объемом модифицированного реагента Эрлиха и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Концентрацию АЛК рассчитывали исходя из величины оптической плотности раствора при 553 нм с использованием молярного коэффициента экстинкции  $6,8 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [29]. Содержание АЛК определяли по разности показателей, полученных после четырех часов инкубации и в нулевой момент времени.

**Активность  $\delta$ -аминолевулинат дегидратазы** (АЛКД, КФ 4.2.1.24) определяли в гомогенатах листьев по методу [29]. Навеску этиолированного материала растирали в ступке в среде выделения (0,33 М сорбитола, 40 мМ HEPES (pH 7,8), 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,1% изоаскорбата натрия), охлажденной до  $0^\circ\text{C}$ . К полученному экстракту добавляли АЛК в концентрации 5 мМ и инкубировали в течение 30 мин при  $37^\circ\text{C}$ . Реакцию останавливали, добавляя трихлоруксусную кислоту, после чего раствор центрифугировали для осаждения белка и к надосадочной жидкости добавляли реактив Эрлиха. После 5 мин прединкубации измеряли оптическую плотность при длине волны 553 нм. Активность АЛКД выражали в нмоль порфобилиногена, образовавшегося из экзогенной АЛК в течение 1 ч, в пересчете на 1 мг белка, используя молярный коэффициент экстинкции  $6,2 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [30]. Содержание белка определяли по методу [31].

**Определение активности Mg-протопорфирин IX хелатазы** (КФ 6.6.1.1). Ферментативную активность хелатазы определяли в хлоропластах, придерживаясь методик, приведенных в работах [27] и [32]. Пластиды из зеленеющих листьев выделяли дифференциальным центрифугированием [33,34], промывали при  $4^\circ\text{C}$  раствором 0,5 М сахарозы, содержащим 20 мМ HEPES (pH 7,7), 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ ЭДТА, 0,2% бычьего сывороточного альбумина, и ресуспендировали в среде, содержащей 0,5 М сахарозы, 20 мМ HEPES (pH 7,7), 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ ,

1 мМ ЭДТА, 2 мМ меркаптоэтанола, 5 мкМ протопорфирин IX и 4 мМ MgATФ в регенерирующей системе (60 мМ фосфокреатин + 4 ед./мл креатинфосфокиназы) при  $30^\circ\text{C}$ , периодически встряхивая. Реакцию останавливали, приливая охлажденный ацетон. Разделение пигментов на фитольные и бесфитольные формы, а также определение количества Mg-протопорфирин проводили, как описано в работе [32]. Активность хелатазы выражали в нмолях монометилового эфира Mg-протопорфирин IX, образующегося в пластидах в течение 1 ч из экзогенных протопорфирин IX и  $\text{Mg}^{2+}$ , в пересчете на 1 мг белка.

**Исследование кинетики флуоресценции.** Переменную флуоресценцию Хл *a* регистрировали при комнатной температуре с помощью ХЕРАМ флуориметра (Walz, Германия). Минимальный уровень флуоресценции адаптированных в течение 5 мин к темноте ( $F_0$ ) и свету ( $F'_0$ ) листьев определяли при воздействии модулированного (2 Гц) света низкой интенсивности ( $\sim 0,1 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ). Индукцию флуоресценции Хл возбуждали светом 175 и 1500  $\text{мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ . Максимальный уровень флуоресценции адаптированных к темноте ( $F_m$ ) и свету ( $F'_m$ ) листьев определяли при освещении насыщающей вспышкой (1 мкс) интенсивностью 3500  $\text{мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ . Для оценки функционального состояния фотосинтетического аппарата были использованы следующие параметры флуоресценции [35]: максимальный квантовый выход фотохимии ФС II – ( $F'_v/F_m$ ); коэффициент фотохимического –  $qP$ ,  $[F'_m - F_s]/[F'_m - F_0]$ , и нефотохимического тушения флуоресценции –  $qN$ ,  $[1 - F'_v/F_v]$ ; коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции по Штерну–Вольмеру –  $NPQ$ ,  $[F'_m/F_v - 1]$ , где  $F_v$  – переменная флуоресценция  $[F_v = F_m - F_0]$ .

**Сухую массу** определяли после высушивания проростков в сушильном шкафу до постоянного веса при температуре  $60^\circ\text{C}$ .

Биохимические исследования проводили в трех–четырёхкратной повторности, результаты обрабатывали статистически с помощью программ Microsoft Excel. Экспериментальные данные представлены в таблицах и на графиках в виде  $M \pm \sigma$ , где  $M$  – среднее арифметическое,  $\sigma$  – стандартное отклонение. Достоверность различий величин оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Клиностамирование является самым распространенным способом имитации эффектов мик-

**Таблица 1.** Содержание пигментов в этиолированных проростках ячменя

Пигменты	Контроль, мкг/г сырой массы	Клиностат, мкг/г сырой массы
β-Каротин	25,78 ± 2,51	32,4 ± 3,04*
Лютеин	24,21 ± 1,26	27,67 ± 2,12**
Виолаксантин	10,46 ± 0,91	9,29 ± 0,82**
Неоксантин	11,85 ± 0,75	12,98 ± 0,64**
Протохлорофиллид	33,73 ± 1,47	30,89 ± 1,58**

Примечание. Содержание пигментов определяли в растениях, выращенных в темноте в течение шести суток. Здесь и далее: \* – достоверность разницы при  $P < 0,05$ ; \*\* – при  $P = 0,05$ .

рогравитации в наземных экспериментах. В настоящей работе растения ячменя выращивали в 2D-клиностате при медленном непрерывном вращении вокруг одной оси, перпендикулярной к направлению вектора силы тяжести [24].

Динамику накопления фотосинтетических пигментов в этиолированных проростках изучали при зеленении шести–девятидневных растений ячменя. В течение первых шести дней темного выращивания опытные проростки

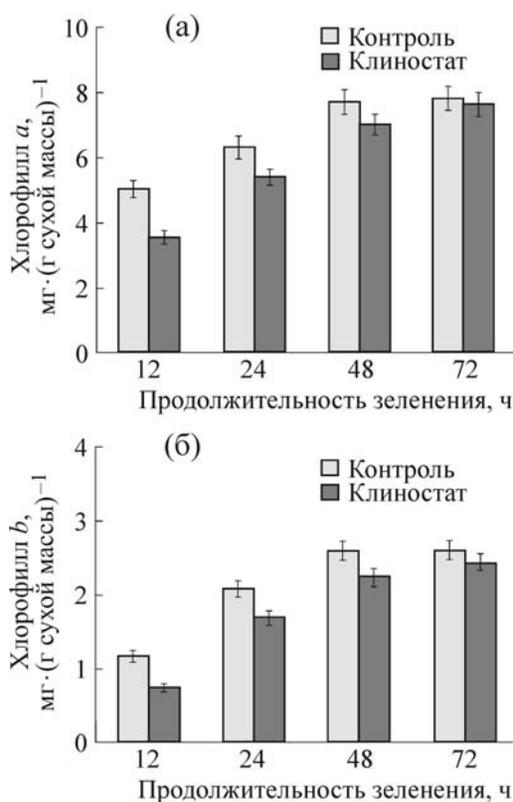
вегетировали при горизонтальном клиностатировании, а контрольные растения – стационарно в вертикальном положении. Непосредственно перед началом зеленения в этиолированных образцах определяли содержание каротиноидов и непосредственного предшественника хлорофилла *a* – протохлорофиллида (ПХд) (табл. 1). Видно, что при клиностатировании содержание β-каротина, лютеина и неоксантина было выше, чем в контроле, соответственно на 20, 13 и 8%. В то же время уровень накопления ПХд и виолаксантина в клиностатированных проростках был на 9–12% ниже, чем в контроле (табл. 1). ПХд является конечным продуктом первой (темновой) фазы биосинтеза Хл, и его преобразование в Хл блокировано в темноте на стадии фотовосстановления, поскольку ключевой фермент протохлорофиллид редуктаза является светозависимым [36].

Данные, представленные на рис. 1, показывают, что через 12 ч освещения количество Хл *a* и Хл *b* в клиностатированных проростках уступало содержанию этих пигментов в контрольных растениях на 43 и 59% соответственно. Различия в общем содержании Хл в опытных и контрольных образцах уменьшалось со временем. Так, если после 12 ч освещения это различие составляло 45%, после 24 ч – 18%; после 48 ч – 12 %, а после 72 ч – около 2%. Таким образом, на основании результатов, представленных на рис. 1, можно сделать вывод, что дезориентация растений в условиях клиностатирования негативно влияет на накопление Хл в этиолированных проростках ячменя лишь на начальных этапах зеленения. По мере развития пигментного аппарата различия в содержании Хл в контрольных и клиностатированных растениях уменьшаются и через 72 ч не превышают ошибки эксперимента.

В ходе зеленения изменялось также соотношение Хл *a*/Хл *b* в контрольных и опытных растениях (табл. 2). Известно, что формирование пула Хл в этиолированных листьях начинается с образования Хл *a*, который при участии хлорофиллид *a* оксигеназы трансформируется в Хл *b* [38]. Поэтому на начальном этапе зеленения содержание Хл *a* значительно превышает содержание Хл *b*, но со временем соотношение Хл *a*/Хл *b* снижается и в зависимости от уровня освещенности устанавливается на уровне 2,5–3,0 [39].

В настоящей работе соотношение Хл *a*/Хл *b* в клиностатированных проростках после 12, 24 и 48 ч зеленения превышало этот показатель в контрольных образцах (табл. 2), что указывает на замедление трансформации Хл *a* в Хл *b*.

После освещения растений в этиолированных проростках наряду с Хл инициируется син-



**Рис. 1.** Содержание хлорофилла *a* (а) и хлорофилла *b* (б) в зеленеющих проростках ячменя в контроле и при клиностатировании.

**Таблица 2.** Соотношение содержания пигментов в клиностатированных проростках ячменя в зависимости от продолжительности зеленения

	Контроль			Клиностат		
	12 ч	24 ч	48 ч	12 ч	24 ч	48 ч
Хл <i>a</i> /Хл <i>b</i>	4,270	3,019	2,958	4,770	3,180	3,120
Каротиноиды/ΣХл	–	0,110	0,108	–	0,111	0,115

Примечание. Соотношение содержания пигментов (моль/моль) рассчитывали, используя значения молекулярных масс каротиноидов, приведенные в работе [26].

тез и других компонентов ФСА, таких как каротиноиды, липиды, белки, и происходит трансформация этиопластов в хлоропласты [40]. Данные о накоплении каротиноидов в проростках в условиях нашего эксперимента представлены на рис. 2. Видно, что при клиностатировании после 48 ч зеленения содержание β-каротина, лютеина и неоксантина возрастало в несколько раз как в контрольных, так и в клиностатированных растениях (рис. 2). При этом темп прироста количества этих каротиноидов в клиностатированных проростках значительно уступал контролю. Накопление виолаксантина за 48 ч освещения возрастало приблизительно на 35% как в контрольных, так и в опытных вариантах, что в десятки раз меньше, чем в случае β-каротина, лютеина и неоксантина. Содержание других ксантофиллов виолаксантинного цикла – антероксантина и зеаксантина [39,41] – оказалось исчезающе малым для количественного определения. В целом данные (рис. 2), полученные при определении динамики изменения содержания каротиноидов при зеленении проростков ячменя, согласуются с результатами, полученными другими авторами [41,42]. В общем, уровень ксантофиллов после 24 ч зеленения в клиностатированных проростках был на 20–23% ниже, чем в контроле, при этом содержание лютеина выросло в контрольном варианте в 7,9 раза, а в клиностатированном – только в 5,3 раза.

Содержание β-каротина в клиностатированных растениях после 24 ч зеленения в сравнении с контролем было на 13% ниже. Дальнейшее зеленение не приводило к изменению темпа накопления β-каротина в проростках ячменя. Через 48 ч освещения различие в общем содержании каротиноидов в контрольных и клиностатированных проростках не превышало ошибки эксперимента. Таким образом, содержание каротиноидов этиолированных проростков в ходе их клиностатирования со временем приближалось к контролю.

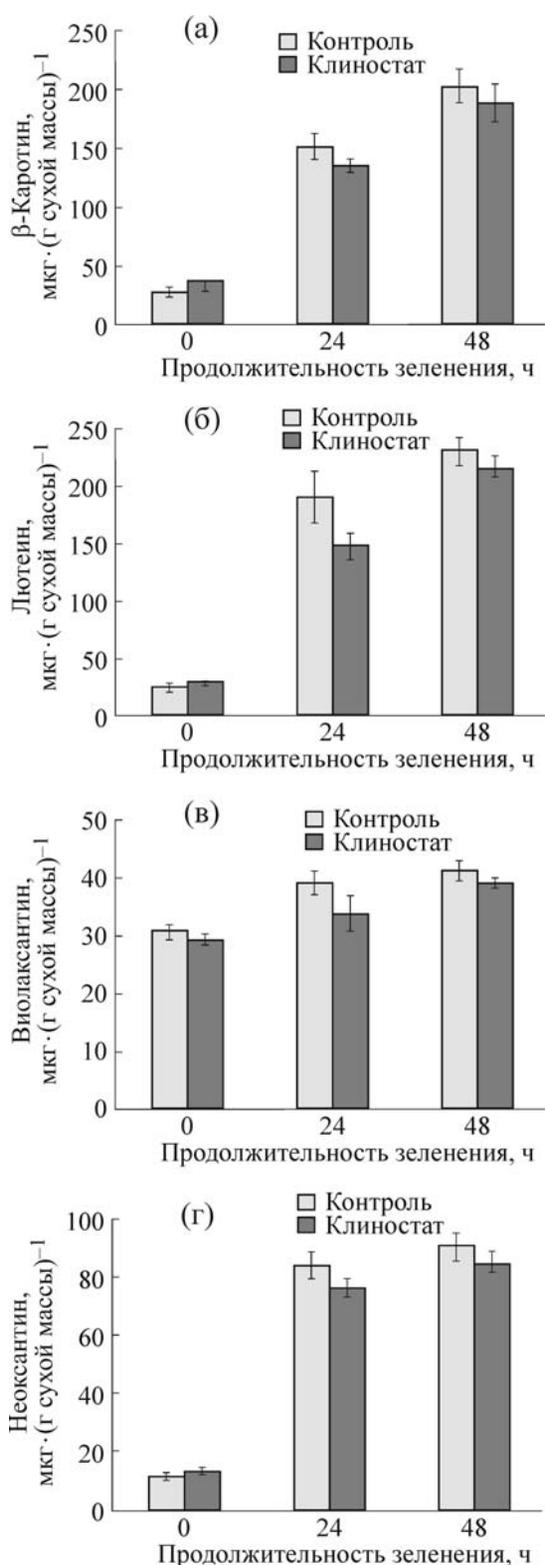
Соотношение общего содержания Хл и каротиноидов в наших экспериментах при зеленении менялось незначительно (табл. 2), т.е.

баланс между этими пигментами в контрольных и клиностатированных ростках не нарушался.

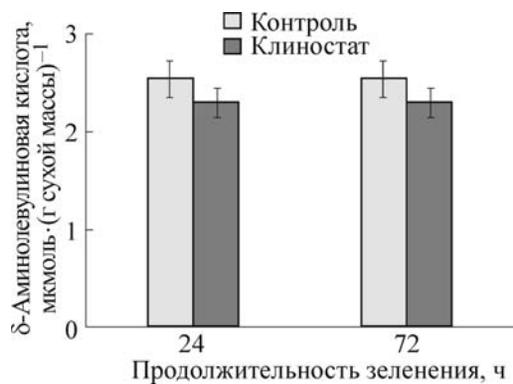
Первой и наиболее чувствительной стадией в системе синтеза Хл, активность которой контролируется как эндогенными, так и экзогенными факторами, является образование δ-аминолевулиновой кислоты [36]. При изучении влияния моделированной микрогравитации на формирование ФСА в работе определяли способность зеленеющих проростков ячменя к накоплению АЛК. На рис. 3 в сравнении показано изменение количества АЛК после 24 и 72 ч зеленения проростков ячменя при клиностатировании и в контроле. Видно, что уровень накопления АЛК в клиностатированных образцах после 24 ч зеленения был несколько ниже, чем в контроле, а после 72 ч зеленения эти показатели не отличались друг от друга.

АЛК является предшественником всех тетрапирролов. При конденсации двух молекул АЛК в реакции, катализируемой АЛКД, синтезируется предшественник порфиринов порфобилиноген [27,28,36]. В настоящей работе исследовалось влияние клиностатирования на активность АЛКД зеленеющих проростков ячменя. Для этого АЛК (субстрат) экзогенно добавляли к экстракту, полученному из этиолированных проростков ячменя. Данные, представленные на рис. 4, показывают, что экстракты контрольных и опытных растений отличались по содержанию порфобилиногена. В контроле оно было на 13 и 9% выше по сравнению с опытом после 12 и 24 ч зеленения соответственно, т.е. активность АЛКД у клиностатированных проростков была ниже контрольной.

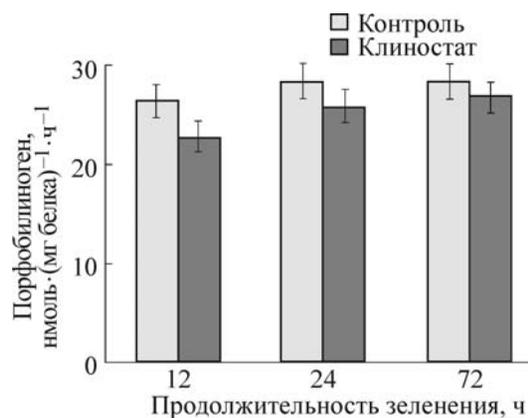
На рис. 5 приведены результаты изучения влияния имитированной микрогравитации на активность Mg-протопорфирин IX хелатазы, фермента, катализирующего начальную реакцию так называемой «магниевого ветви» биосинтеза Хл – формирование комплекса Mg<sup>2+</sup> и протопорфирина IX [36,38,42]. Видно, что в условиях наших экспериментов накопление Mg-протопорфирина IX практически не отличалось у хлоропластов, изолированных из клиностатированных и контрольных проростков ячменя, как после зеленения в течение 24 ч, так и 72 ч.



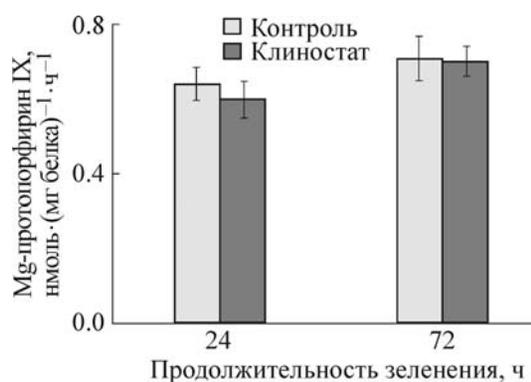
**Рис. 2.** Содержание каротиноидов в зеленеющих проростках ячменя в контроле и при клиностаტიровании:  $\beta$ -каротина (а), лютеина (б), виолаксантина (в) и неоксантина (г).



**Рис. 3.** Содержание АЛК в зеленеющих проростках ячменя в контроле и при клиностаტიровании. Для накопления АЛК листья инкубировали на свету в течение 4 ч на 60 мМ растворе левулиновой кислоты (рН 7,5).



**Рис. 4.** Активность АЛКД в зеленеющих проростках ячменя в контроле и при клиностаტიровании.



**Рис. 5.** Активность Mg-протопорфирин IX хелатазы в зеленеющих проростках ячменя в контроле и при клиностаტიровании.

Пигменты, образующиеся при зеленении, связываются с апобелками и стабилизируют их с образованием пигмент-белковых комплексов,

**Таблица 3.** Параметры фотохимической активности зеленеющих листьев ячменя по результатам амплитудно-модулированной импульсной флуориметрии

Показатель	Активирующий свет, мкмоль·м <sup>-2</sup> ·с <sup>-1</sup>			
	175		1500	
	Контроль	Клинонат	Контроль	Клинонат
Продолжительность зеленения 24 ч				
$F_v/F_m$	0,772 ± 0,0197	0,754 ± 0,037	0,747 ± 0,034	0,740 ± 0,052
$qP$	0,915 ± 0,006	0,910 ± 0,006	0,770 ± 0,007	0,756 ± 0,006**
$qN$	0,215 ± 0,009	0,221 ± 0,0221	0,760 ± 0,045	0,747 ± 0,009
$NPQ$	0,182 ± 0,0091	0,191 ± 0,0052	1,242 ± 0,191	1,446 ± 0,070**
Продолжительность зеленения 48 ч				
$F_v/F_m$	0,805 ± 0,005	0,806 ± 0,009	0,793 ± 0,006	0,795 ± 0,011
$qP$	0,934 ± 0,004	0,923 ± 0,007	0,730 ± 0,060	0,643 ± 0,009*
$qN$	0,230 ± 0,0159	0,217 ± 0,005	0,686 ± 0,022	0,701 ± 0,015
$NPQ$	0,218 ± 0,020	0,219 ± 0,004	1,108 ± 0,038	1,239 ± 0,063*

постепенное накопление которых приводит к формированию фотохимически активного ФСА [43]. Фотохимическую активность зеленеющих листьев оценивали методом амплитудно-модулированной импульсной флуоресценции Хл при умеренной (175 мкмоль·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>) и высокой интенсивности (1500 мкмоль·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>) активирующего света. Из данных, представленных в табл. 3, видно, что все измеренные параметры, характеризующие состояние ФСА – максимальная эффективность ФС II ( $F_v/F_m$ ), фотохимическое тушение флуоресценции  $qP$ , нефотохимическое тушение  $qN$  и нефотохимическое тушение по Штерну–Вольмеру  $NPQ$  – при умеренной интенсивности активирующего света (175 мкмоль·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>) практически не отличались у клинонатирированных и контрольных растений как через 24, так и через 48 ч зеленения.

При активации фотохимических реакций в зеленеющих проростках светом высокой интенсивности (1500 мкмоль·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>) обозначилось отчетливое различие в параметрах нефотохимического тушения флуоресценции  $NPQ$  и фотохимического тушения флуоресценции  $qP$  через 48 ч зеленения. Отличие от контроля параметров  $qP$  и  $NPQ$  у клинонатирированных проростков, зеленеющих в течение 24 ч, было менее выражено.

Параметр  $NPQ$ , так же как и параметр  $qN$ , является мерой тепловой диссипации избытка возбуждающей энергии и характеризует защитный потенциал растения в условиях фотоингибирования [35]. Следовательно, изменение уровня этого показателя в процессе зеленения указывает на большую уязвимость растений ячменя

в условиях клинонатирирования к повреждающему действию избытка света.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Зеленение этиолированных проростков является полезной моделью, позволяющей оценить влияние стрессовых факторов на формирование фотосинтетического аппарата [27,28,32,36], и использовалось в настоящей работе для анализа влияния клинонатирирования на биосинтез фотосинтетических пигментов. Этиоляция может рассматриваться как стресс, вызванный отсутствием освещения растений и проявляющийся на морфологическом уровне удлинением побегов, тонкими стеблями, бледно-желтой окраской. На молекулярном уровне этиоляция характеризуется отсутствием компонентов, отвечающих за поглощение света и включающихся в первичные реакции его превращения в энергию химических связей.

Биосинтез Хл состоит из 18 ферментативных реакций, которые можно объединить в три подгруппы: 1) образование АЛК, 2) трансформация восьми молекул АЛК в молекулу тетрапиррола – протопорфирин IX и 3) включение Mg<sup>2+</sup> и преобразование Mg-порфирина в липофильный Хл. Часть реакций биосинтеза Хл протекает в темноте. Продуктом темного этапа является ПХд, дальнейшее свето-индуцируемое превращение которого в хлорофиллид протекает с высокой скоростью в зависимости от интенсивности и качества освещения [36,44,45]. Первичное регулирование пути биосинтеза Хл, как полагают, происходит до образования АЛК, о чем свидетельствуют следующие факты: (а) если зеленеющие листья перенести в темноту,

то в них накапливается единственный промежуточный продукт – ПХд; (б) экзогенная АЛК в темноте превращается в ПХд, а часть ПХд, образовавшегося из экзогенного АЛК, трансформируется в Хл при последующем освещении [46].

Стрессовые факторы, такие как действие тяжелых металлов, водный дефицит, осмотический или солевой стресс, ингибируют накопление Хл как на начальной, так и на заключительной стадиях биосинтеза пигмента [27,28,32]. Условия микрогравитации, как показали исследования последних 50 лет [1,2,4,9–12,19–22], вызывают развитие стрессовых нелетальных реакций в растениях. Имеющиеся данные о влиянии микрогравитации на фотосинтетический аппарат противоречивы [1–3,19–23], что может быть связано с тем, что дезориентация ростовых реакций растения в отсутствие гравитационного вектора частично компенсируется координирующей ролью фототропизма.

Результаты, полученные в настоящей работе, дают основание полагать, что в отсутствие гравитационного и светового векторов тормозится темновая фаза биосинтеза Хл (рис. 1). Об этом свидетельствует снижение накопления ПХд в этиолированных проростках (табл. 1), а также ингибирование синтеза АЛК и активности АЛК-дегидратазы в зеленеющих растениях при клиностаировании (рис. 3 и 4). Отставание в накоплении фотосинтетических пигментов при формировании ФСА в условиях микрогравитации (рис. 1 и 2) регистрировалось на начальных этапах зеленения. По мере развития проростков количественные различия в составе пигментов уменьшались и практически исчезали после 72 ч экспозиции. Таким образом, торможение темновой фазы биосинтеза Хл и становления ФСА в условиях имитированной микрогравитации эффективно устраняется при световой стимуляции.

Нарушения в развитии отмечаются у многих организмов на ранних этапах развития при воздействии реальной или моделированной микрогравитации [47]. Их связывают с работой механочувствительных каналов [47], перестройками элементов цитоскелета [1,2,47], функционированием специализированных гравичувствительных клеток [1,2]. Ориентация растений в условиях невесомости может быть обеспечена фототропизмом в направлении источника света. При этом экспериментально показано, что корни растут в направлении, противоположном источнику освещения [2]. Следовательно, благодаря позитивному и негативному фототропизму в отсутствие гравитационного стимула облегчается адаптация растений к условиям невесомости.

## ВЫВОДЫ

Первые этапы биосинтеза хлорофилла, протекающие в темноте, тормозятся в отсутствие гравитационного и светового векторов. В ходе освещения первоначальное отставание в развитии ФСА и накоплении фотосинтетических пигментов у проростков, вегетирующих в условиях моделированной микрогравитации, сокращается и практически исчезает после 72 ч световой экспозиции. Полученные результаты свидетельствуют о том, что свет в определенной степени уменьшает негативное влияние микрогравитации на формирование фотосинтетического аппарата в растениях.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. L. Paul, R. M. Wheeler, H. G. Levine, et al., *Amer. J. Bot.* **100** (1), 226 (2013).
2. E. L. Kordyum, *Plant Biol.* **16**, 79 (2014). doi:10.1111/plb.12047
3. M. E. Musgrave, A. Kuang, C. S. Brown, et al., *Ann. Bot.* **81** (4), 503(1998).
4. S. A. Wolff, L. H. Coelho, M. Zabrodina, et al., *Adv. Space Res.* **51**, 465 (2013).
5. М. А. Левинских, В. Н. Сычев, Т. А. Дерендяева и др., *Авиакосм. экол. мед.* **35**, 45 (2001).
6. S. Jiao, E. Hilaire, A. Q. Paulsen, et al., *Physiol. Plantarum* **122** (2), 281 (2004).
7. B. M. Link, J. S. Busse, and B. Stankovic. *Astrobiol.* **14** (10), 866 (2014).
8. V. N. Sychev, M. A. Levinskikh, S. A. Gostimsky, et al., *Acta Astronaut.* **60** (4–7), 426 (2007).
9. В. Б. Румянцева, М. Н. Мерзляк, А. Л. Машинский и др. *Косм. биол. авиакосм. мед.* **1**, 53 (1990).
10. N. I. Adamchuk, N. F. Mikhaylenko, E. K. Zolotareva, et al., *J. Gravit. Physiol.* **6** (1), 95 (1999).
11. A. L. Paul, A. K. Zupanska, D. T. Ostrow, et al., *Astrobiol.* **12** (1), 40 (2012).
12. N. I. Adamchuk, R. N. Fomishina, N. F. Mikhaylenko, and E. K. Zolotareva, *J. Gravit. Physiol.* **6** (1), 143 (1999).
13. G. W. Stutte, O. Monje, G. D. Goins, et al., *Planta* **223**, 46 (2005).
14. B. C. Tripathy, C. S. Brown, H. G. Levine, et al., *Plant Physiol.* **110** (3), 801 (1996).
15. B. Chen, A. Zhang, Q. Lu, et al., *Photosynth. Res.* **116**, 93 (2013).
16. E. K. Zolotareva, E. B. Onoiko, S. K. Sytnik, et al., *J. Gravit. Physiol.* **6** (1), 147 (1999).
17. B. Chen and Y. Wang, *Photochem. Photobiol.* doi: 10.1111/php.12593 (2016).
18. A. K. Zupanska, F. C. Denison, R. J. Ferl, et al., *Amer. J. Bot.* **100** (1), 235 (2013).
19. A. A. Aliyev, Z. K. Abilov, A. L. Mashinsky, et al., *USSR Space Life Sci. Digest* **10**, 15 (1987).

20. C. S. Brown, B. C. Tripathy, and G. W. Stutte, in *Plants in space biology*, Ed. by H. Suge (Sendai, Japan: Institute of Genetic Ecology, Tohoku University, 1996), IGE series, Vol. 22, pp. 127–134.
21. S. S. Jagtap, R. B. Awhad, B. Santosh, et al., *Micrograv. Sci. Technol.* **23** (1), 41 (2011).
22. R. S. Laurinavichius, A. V. Yaroshyus, A. Marchyukaytis, et al., *USSR Space Life Sci. Digest* **4**, 23 (1986).
23. N. F. Mikhaylenko, S. K. Sytnik, and E. K. Zolotareva, *Adv. Space Res.* **27** (5), 1007 (2001).
24. H. Wang, X. Li, and L. Krause, *Micrograv. Sci. Technol.* **28** (1), 59 (2016).
25. *Методы биохимического анализа растений* (Изд-во ЛГУ, Л., 1978).
26. H. K. Lichtenthaler, *Meth. Enzymol.* **148**, 350 (1987).
27. A. K. Tewari and B. C. Tripathy, *Plant Physiol.* **117** (3), 851 (1998).
28. S. Turan and B. C. Tripathy, *Physiol. Plantarum* **153** (3), 477 (2015).
29. D. Mauzerall and S. Granick, *J. Biol. Chem.* **219** (1), 435 (1956).
30. K. Kaul and P. S. Sabharwal, *Plant Physiol.* **54** (3), 644 (1974).
31. M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
32. E. M. Chekunova, E. B. Yaronkaya, N. V. Yartseva, et al., *Russ. J. Plant Physiol.* **61** (2) 169 (2014).
33. E. K. Золотарева, А. Ф. Терещенко, Е. Ф. Довбыш и Е. Б. Онойко, *Биохимия* **62** (6), 631 (1997).
34. E. K. Zolotareva, M. E. Gasparyan, and L. S. Yaguzhinsky, *FEBS Lett.* **272** (1–2), 184 (1990).
35. K. Maxwell and G. N. Johnson, *J. Exp. Bot.* **51** (345), 659 (2000).
36. Н. Г. Аверина и Е. Б. Яронская, *Биосинтез тетрапирролов в растениях* (Беларуская навука, Минск, 2012).
37. Г. Бриттон, *Биохимия природных пигментов* (Мир, М., 1986).
38. R. Tanaka and A. Tanaka, *Ann. Rev. Plant Biol.* **58**, 321 (2007).
39. F. Babani, and H. K. Lichtenthaler, *J. Plant Physiol.* **148** (5), 555 (1996).
40. J. C. Gray, J. A. Sullivan, J. H. Wang, et al., *Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. B, Biol. Sci.* **358** (1429), 135 (2003).
41. H. A. Frank and R. J. Cogdell, *Photochem. Photobiol.* **63** (3), 257 (1996).
42. Н. М. Гоман, М. С. Радюк и Л. И. Фрадкин, *ДАН Беларуси* **44** (5), 77 (2000).
43. B. J. Pogson, D. Ganguly, and V. Albrecht-Borth, *Biochim. Biophys. Acta* **1847** (9), 1017 (2015).
44. P. Brzezowski, A. S. Richter, and B. Grimm, *Biochim. Biophys. Acta* **1847** (9), 968 (2015).
45. N. M. Topchiy, S. K. Sytnik, O. O. Syvash, and E. K. Zolotareva, *Photosynthetica* **43** (3), 451 (2005).
46. G. Horváth, M. Droppa, Á. Oravec, et al., *Planta* **199**, 238 (1996).
47. I. V. Ogneva, *Biophysics* **60** (5), 849 (2015).

## The Effect of Simulated Microgravity on Formation of the Pigment Apparatus in Etiolated Barley Seedlings

E.B. Onoiko\*, V.V. Podorvanov\*, S.K. Sytnik\*\*, and A.A. Sivash\*

\*Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, ul. Tereschenkivska 2, Kiev, 01601 Ukraine

\*\*Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, ul. Vasylykovska 31/17, Kiev, 03022 Ukraine

The effect of the horizontal clinorotation on the dynamics of the accumulation of the main photosynthetic pigments in the greening of 6-day-old etiolated barley seedlings has been studied. The content of protochlorophyllide, the direct precursor of chlorophyll *a*, in clinorotated seedlings in the dark was 9–20% lower than in the control group. After exposure of barley seedlings to light for 12 hr under clinorotation, chlorophyll accumulation lagged by 45% behind control, and after 48–72 hrs reaching a control value. The total content of carotenoids increased many-fold during greening and, at the first stage the carotenoid level in clinorotated seedlings was less than in the control. The synthesis rates of  $\delta$ -aminolevulinic acid and  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity in clinorotated seedlings were slower than in the control after 24 hrs of greening and after 72 hrs of greening reaching the control values. The activity of Mg-protoporphyrin IX chelatase catalyzing the incorporation of Mg ions in the structure of chlorophyll *a*, did not change when exposed to clinorotation. The results obtained show inhibition of the initial stages of chlorophyll biosynthesis in the conditions of simulated microgravity. The light, to a certain extent, decreases the negative effect of microgravity on the formation of the photosynthetic apparatus in plants.

*Keywords:* gravitropism, chlorophyll biosynthesis, photosynthesis, etiolated plants, phototropism, *Hordeum vulgare* L.