

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
КАЗАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ КФ АН СССР

На правах рукописи

ФИЛИМОНОВ Андрей Андреевич

УДК 581.132:581.522.4

**СТРУКТУРНО – ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ
ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА
ПРИ ТЕПЛОВОЙ АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ**

(03.00.12 – физиология растений)

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

КАЗАНЬ 1988

1992 г.

Работа выполнена в Институте биологии Карельского филиала Академии наук СССР.

Научные руководители: Заслуженный деятель науки РСФСР и Карельской АССР, доктор биологических наук, профессор С.Н. ДРОЗДОВ

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник А.Ф. ТИТОВ

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор В.Е. ПЕТРОВ

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник С.В. КЛИМОВ

Ведущая организация: Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

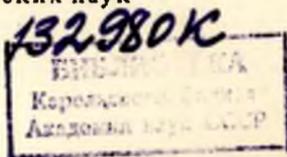
Защита состоится " 15 " декабря " 1988 года в 13 часов на заседании Специализированного совета К.002.16.01 по присуждению ученой степени кандидата биологических наук при Казанском институте биологии КФ АН СССР по адресу: 420084, Казань, ул. Лобачевского, а/я 30.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского института биологии КФ АН СССР.

Автореферат разослан " _____ " 1988 года.

Ученый секретарь
Специализированного совета
кандидат биологических наук

Н.Л. ЛОСЕВА



Актуальность темы. Проблема устойчивости растений к экстремальным температурам относится к числу важнейших в современной физиологии. Ее изучение имеет не только большое теоретическое, но и практическое значение, поскольку без четких представлений о природе устойчивости трудно добиться существенного повышения эффективности селекционной работы, направленной на создание высокоустойчивых сортов, а также ускорить разработку надежных экспресс-методов ее диагностики.

К настоящему времени накоплен обширный фактический материал, свидетельствующий о том, что к наиболее термолabileльным клеточным функциям относятся реакции фотосинтеза (Александров, 1975; Лархер, 1978). Подразумевается, что их низкая термостабильность ограничивает адаптивные возможности ассимилирующих клеток.

Как известно, устойчивость последних не остается постоянной, а варьирует в зависимости от температуры, сопутствующих температуре условий среды, видовых (сортовых) особенностей объекта, фазы его развития и т.д. (Бабль, 1965; Levitt, 1980; Дроздов и др., 1984). Способность к изменениям теплоустойчивости обладают и отдельные компоненты фотосинтетического аппарата (ФСА) (Веггу, Bjorkman, 1980).

Центральную роль в температурной адаптации растений многие авторы отводят белковому комплексу клетки. При этом одни из них видят главную причину роста устойчивости клеток в конформационной перестройке предсуществующих белков (Александров, 1975, 1985), тогда как другие связывают ее с дифференциальной экспрессией генов и синтезом стрессовых белков (Weiser, 1970; Титов, 1978; Петровская-Баранова, 1983; Войников, 1986). Своих сторонников имеют и другие концепции, выдвигающие на первый план изменение свойств липидов (Lyon, 1973; Хохлова, 1985), гормонального баланса (Гуревич, 1979), энергетического обмена (Петров и др., 1986) и т.д.

Важно, однако, что каждый уровень структурной иерархии биологических систем (молекулярный, субклеточный, клеточный и др.) характеризуется своими адаптивными возможностями (Леквичус, 1986). Исходя из этого можно, по-видимому, ожидать, что и природа (механизмы) адаптивных реакций, развивающихся на уровне целой клетки и ее органелл (в частности, хлоропластов), будет различной. Насколько подобные представления соответствуют действительности, должны показать специальные исследования.

Цель и задачи исследований. Цель работы состояла в исследовании структурно-функциональных изменений отдельных компонентов ФСА при тепловой адаптации растений. При этом предполагалось решить следу-

щие задачи:

- изучить особенности динамики термостабильности фотосинтетических мембран при тепловой адаптации растений и сопоставить их с динамикой теплоустойчивости клеток;

- исследовать характер изменений термостабильности фотосинтетических мембран при общей модификации их структуры и функции ингибиторами белкового синтеза или адаптогеном (мивалом);

- исследовать характер изменений термостабильности фотосинтетических мембран при локальной модификации их структуры и функции ингибиторами компонентов электронтранспортной цепи;

-изучить особенности влияния тепловой адаптации растений на функциональные свойства РДФ-карбоксилазы/оксигеназы (РДФК/О) - ключевого фермента ассимиляции углекислоты.

Научная новизна работы. Впервые проведено сравнительное изучение динамики показателей, характеризующих изменение температурной устойчивости клеток листа и мембран их ФСА при тепловой адаптации холодостойкого (озимая пшеница) и теплолюбивого (огурец) видов растений. Установлено, что у обоих объектов увеличение термостабильности мембранных структур происходит в опережающем рост теплоустойчивости клеток темпе. Существенно, что реорганизация ФСА, в отличие от адаптивных сдвигов клеточной устойчивости, может происходить при закаливании растений даже в присутствии ингибиторов белкового и энергетического обмена. Обработка растений при физиологически нормальной температуре мивалом, обладающим адаптогенным действием, вызывала эффект, аналогичный тепловому закаливанию. Причем подъем термостабильности мембран ФСА и теплоустойчивости клеток под влиянием данного адаптогена наблюдается и на фоне подавленного соответствующими ингибиторами белкового синтеза. Помимо этого показано, что инактивация 70S рибосом (с помощью хлорамфеникола) у подвергнутых тепловому закаливанию растений препятствует повышению активности РДФК/О, определяемой в смеси легкорастворимых белков листьев. Вместе с тем, направленность сдвигов активности фермента зависела от степени его очистки.

Практическая значимость работы. Наличие высокой положительной корреляции ($r=0,9$ при $P \leq 0,05$) между значениями температуры гибели 50% клеток (LT_{50}) и 50%-ного снижения интенсивности замедленной флуоресценции хлорофилла ($T_{0,5}$) позволяет рекомендовать последний показатель для сравнительной оценки видов и сортов растений по теплоустойчивости. Результаты опытов с мивалом могут найти применение при разработке приемов быстрого повышения устойчивости растений к

высоким температурам. Кроме того, предложен метод идентификации РДФК/0 (заявка № 4293009/31-13, решение о выдаче а.с. от 16.06.88 г.) позволяющий производить быстрое и специфичное окрашивание данного фермента после электрофоретического разделения смеси растительных белков.

Работа выполнялась по плану НИР Института биологии Карельского филиала АН СССР (№ государственной регистрации 81057490), входящих в НТП 0.51.01.(Т1.01.05.05) ГКНТ СССР.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены: на Всесоюзном симпозиуме "Биохимиллюминесценция в медицине и сельском хозяйстве" (Ташкент, 1986), на IУ Международном молодежном симпозиуме "Регуляция метаболизма растений" (ИРБ, Варна, 1986); на I Всесоюзном симпозиуме "Стрессовые белки растений" (Иркутск, 1987); на 7-й конференции молодых ученых-биологов "Изучение, рациональное использование и охрана природных ресурсов" (Уфа, 1987); на научно-практической конференции "Биологически активные вещества в сельском хозяйстве" (Ленинград, 1987); на Международной конференции "Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины" (Харьков, 1988); на 6-й конференции молодых ученых "Механизмы регуляции функционирования биологических систем и методы их изучения" (Казань, 1988); на III Всесоюзной конференции молодых ученых по физиологии растительной клетки (Петрозаводск, 1988).

Публикации. По результатам диссертации опубликовано 13 научных работ и получено 1 авторское свидетельство.

Объем работы. Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов и списка литературы. Материал изложен на 139 страницах, включающих 5 таблиц и 27 рисунков. Список литературы содержит 3/8 источников (1/33 на русском и 1/50 на иностранных языках).

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования использовали 7-дневные проростки озимой пшеницы (с. Мироновская 808) и огурца (с. Алма-Атинокий), выращенные в рулонах фильтровальной бумаги на половинном питательном растворе Кнопа (рН 6,4) в камерах искусственного климата (Дроздов и др., 1977; Курец, Попов, 1979) при постоянных условиях среды: температуре воздуха 23-25°C, его относительной влажности 60-70%, освещенности около 10 клк и 14-часовом фотопериоде.

Тепловое закаливание обоих объектов проводили в течение 1 сут при 40°, а холодное - в течение 7 сут при 2° (пшеница) и 3 сут при 10° (огурец) при неизменном уровне других факторов. Часть растений

за сутки до начала закалывания переносили на растворы антимицина А (АА, 10^{-4} М), диурона (ДХМ, $5 \cdot 10^{-5}$ М), актиномицина Д (АКТ, 50 мг/л), циклогексимида (ЦГ, 10 мг/л), хлорамфеникола (ХФ, 200 мг/л), мивала (0,15%), либо смеси последнего с ХФ или ЦГ.

Термостабильность мембран ФСА характеризовали значением температуры ($T_{0,5}$), вызывавшей 50%-ное (в сравнении с максимальным уровнем) снижение интенсивности замедленной флуоресценции (ЗФ) хлорофилла листьев (рис. 1).

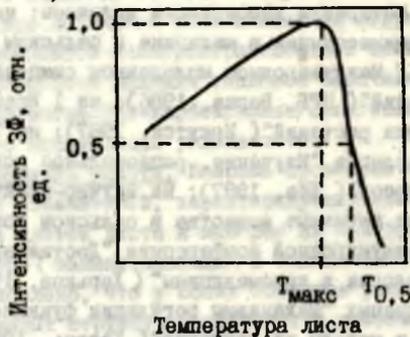


Рис. 1. Температурная зависимость стационарного уровня ЗФ хлорофилла листьев.

Регистрацию температурной зависимости стационарного уровня ЗФ осуществляли на квантометрической установке, снабженной фосфороскопом (Виралайнен, 1986), в интервале 3,0-16,5 мс после перекрывания светового пучка (освещенность объекта при остановленных дисках фосфороскопа - 2 клк, продолжительность освещения - 2 мс). Приемником излучения служил фотоумножитель ФЭУ-79, работавший в режиме счета квантов. Нагревание объекта от 20 до 50° происходило со скоростью 1-2 град/мин.

О тепло- и холодоустойчивости клеток судили по температуре (LT_{50}), приводившей к гибели 50% их после 5-минутного тестирующего прогрева листовых высечек в водном термостате (Александров, 1963) или промораживания в термоэлектрическом микрохолодильнике (Дроздов и др., 1976), соответственно.

Выделение и очистку РДФК/О проводили по методике Холла и Толберта (Hall, Tolbert, 1978), определение карбоксилазной и оксигеназной активности - по А.К. Романовой (1980).

Электрофоретическое разделение смеси легкорастворимых белков листьев и оценку чистоты препарата РДФК/О выполняли по методу Дэви-

са (Davis, 1964) в модификации В.И. Сафонова и М.П. Сафоновой (1971) Промытые водой гели в течение 8-10 час инкубировали в 0,01%-ном растворе красителя амидочерный. Растворителем для него служила 7%-ная уксусная кислота, которую использовали и для отмывки электрофореграмм от избытка красителя. С целью идентификации РДФК/О гели выдерживали в 0,3%-ном растворе феназинметасульфата до появления интенсивных розовых полос в месте локализации фермента.

Содержание белка определяли по связыванию красителя кумасси бриллиантовый G-250 (Bradford, 1976), а также путем регистрации поглощения в УФ-области (Whitaker, Galum, 1980). В обоих случаях для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин.

Повторность в пределах одного опыта - 6-кратная, а каждый опыт, как правило, повторяли 3-5 раз. Результаты экспериментов обработаны статистически (Рокицкий, 1973; Доспехов, 1979).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Влияние закалывающей температуры на термостабильность мембран ФСА и теплоустойчивость клеток листа

Результаты исследований показали, что под влиянием температуры 40° у обоих видов растений наблюдается заметное повышение уровня $T_{0,5}$ и LT_{50} , причем корреляция между ними была довольно высокой ($r = 0,87-0,94$ при $P \leq 0,05$). Существенно, что прирост термостабильности ФСА происходил с большей скоростью, чем подъем теплоустойчивости клеток (рис. 2).

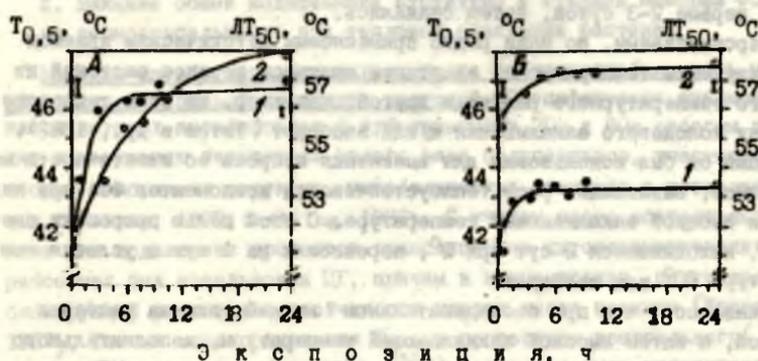


Рис. 2. Динамика теплоустойчивости мембран ФСА (1) и клеток листа (2) пшеницы (А) и огурца (Б) при 40° . Здесь и далее на рис. 2-6: $T_{0,5}$ - термостабильность мембран ФСА, LT_{50} - теплоустойчивость клеток.

Интересно, что изменения теплоустойчивости наблюдались и в условиях гипотермии. Из данных, приведенных на рис. 3 видно, что при

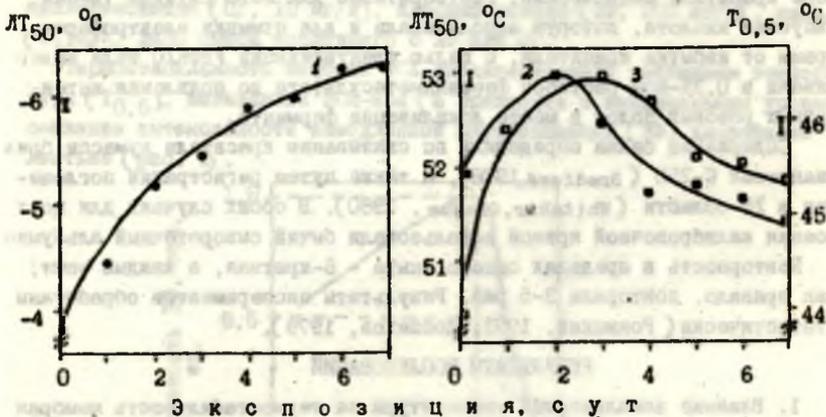


Рис. 3. Динамика холодо- (1) и теплоустойчивости (2) клеток листа и термостабильности мембран ФСА (3) пшеницы при 2°.

температуре 2° у проростков пшеницы происходило повышение не только холодо-, но и теплоустойчивости клеток, а также термостабильности компонентов мембран ФСА. Вместе с тем, динамика названных показателей имела свои особенности: если холодостойкость клеток в течение всего опыта монотонно возрастала, то два других, достигнув максимума в первые 2-3 суток, затем снижались.

Перспективным, но пока редко применяемым методическим приемом при изучении температурной адаптации является перенос растений из одного температурного режима в другой, например, из зоны теплового в зону холодого закаливания и/или наоборот (Титов и др., 1982).

Нами он был использован для выяснения вопроса об идентичности механизмов, вызывающих рост теплоустойчивости компонентов ФСА при низкой и высокой закалывающей температуре. С этой целью проростки пшеницы, находившиеся 2 сут при 2°, переносили на 1 сут в условия температуры 40° или наоборот.

Оказалось, что при последовательном воздействии на растения низкой, а затем высокой закалывающей температуры, дополнительного увеличения термостабильности мембран ФСА не происходило. Смена тепла на холод (40° → 2°) также не вызывала дополнительного прироста $T_{0,5}$ - как, впрочем, и ее спада. Последнее, скорее всего, связано с кратковременностью холодого воздействия. Действительно, при более

длительной экспозиции при 2° у предварительно адаптированных к теплу растений пшеницы отмечалось снижение $T_{0,5}$, хотя и не такое быстрое, как изменение уровня LT_{50} (рис. 4).

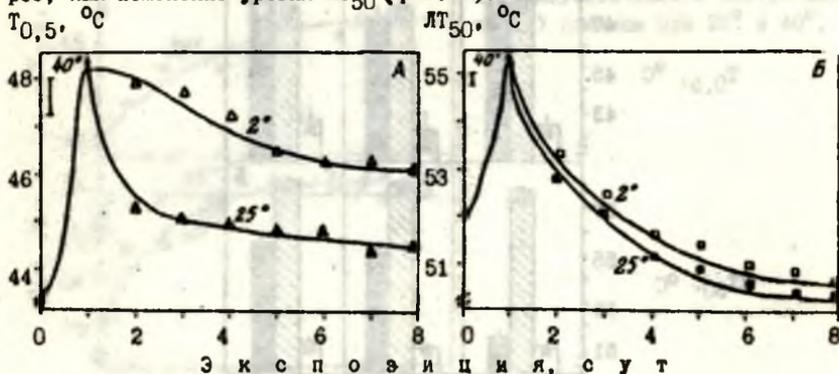


Рис. 4. Динамика термостабильности мембран ФСА (А) и теплоустойчивости клеток листа (Б) пшеницы при смене температурных режимов (момент изменения температуры указан стрелкой).

Выявленные в этих опытах особенности динамики показателей $T_{0,5}$ и LT_{50} позволяют, на наш взгляд, говорить о функциональной автономности механизмов, определяющих уровень термостабильности мембран ФСА и теплоустойчивости клеток.

2. Влияние общей модификации структуры и функции мембран ФСА на их термостабильность при тепловой адаптации растений

Влияние ингибиторов биосинтеза белка на термостабильность мембран ФСА при тепловой адаптации растений. Специфическое взаимодействие некоторых антибиотиков с субъединицами 70S и 80S рибосом приводит к нарушению биосинтеза целого ряда полипептидов, участвующих в сборке мембранных структур, метаболических реакциях в цитоплазме и т.д. (Хавкин, 1977; Gailling, 1982). С учетом этого обстоятельства нами для подавления процессов трансляции на цитоплазматических 80S рибосомах был использован ЦГ, причем в концентрации, почти полностью блокирующей рост теплоустойчивости клеток листа пшеницы (Критенко, 1987). Тем не менее, значения $T_{0,5}$ у проростков контрольного (закалка без ЦГ) и опытного (закалка с ЦГ) вариантов были практически одинаковыми (рис. 5А). Аналогичная картина наблюдалась и в случае применения ХФ (блокирующего синтез белка на 70S рибосомах), а также АКГ (блокирующего синтез РНК). Хотя все указанные выше соединения

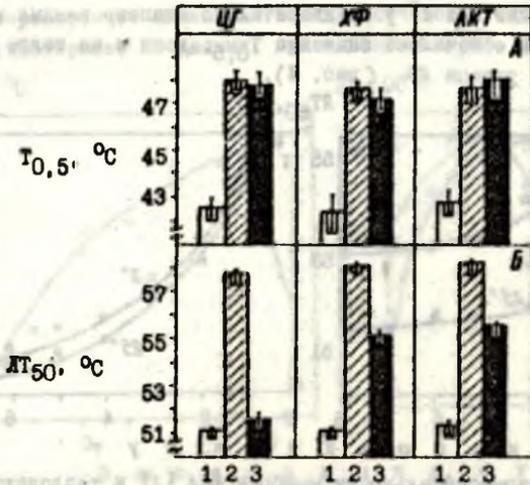


Рис. 5. Влияние ингибиторов биосинтеза белка на термостабильность мембран ФСА (А) и теплоустойчивость клеток листа (Б) пшеницы при 40°. 1 - контроль (исходный уровень); 2 - закалка без ингибитора; 3 - закалка с ингибитором.

блокировала процесс увеличения теплоустойчивости клеток листа при тепловом закаливании проростков, величина эффекта варьировала в зависимости от типа ингибитора и была наибольшей в случае II (рис. 5Б).

Следовательно, можно заключить, что увеличение теплоустойчивости клеток существенным образом зависит от функциональной активности их белоксинтезирующей системы и, в первую очередь, рибосом цитоплазмы. Что же касается термостабильности компонентов мембран ФСА, то ее повышение может происходить и на фоне подавленного новообразования белка.

Влияние адаптогена (мивала) на термостабильность мембран ФСА при тепловой адаптации растений. Обработка незакаленных проростков пшеницы мивалом вызвала увеличение их теплоустойчивости. Причем в случае показателя $T_{0.5}$ концентрационная кривая выходила на плато не достигая уровня, характерного для адаптированных к теплу растений (рис. 6А). Рост LT_{50} по мере увеличения дозы адаптогена продолжался вплоть до максимальных (индуцируемых закалкой) значений. Интересно, что при 40° графики концентрационных зависимостей для обоих показателей имели сходный характер (значения как $T_{0.5}$, так и LT_{50}

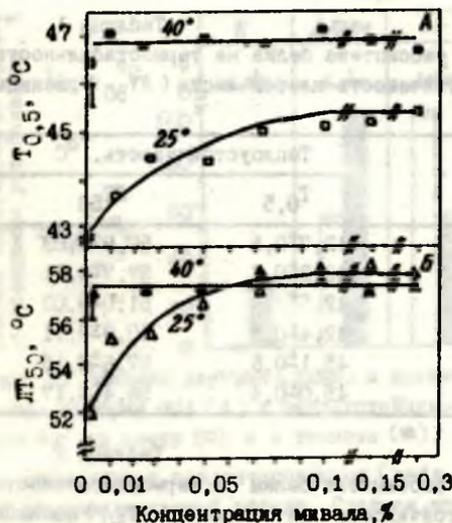


Рис. 6. Влияние мивала на термостабильность мембран ФСА (А) и теплоустойчивость клеток листа (Б) пшеницы при 25° и 40°.

при разных концентрациях мивала были довольно близкими).

Для выяснения возможной роли белоксинтезирующей системы в сдвигах устойчивости, обусловленных влиянием адаптогена, проростки пшеницы последовательно переносили на растворы ингибиторов синтеза белка (ЦГ или ХФ), а затем - на мивал. Указанные антибиотики не влияли на уровень теплоустойчивости незакаленных растений, в то время как процесс теплового закаливания ингибировался ими на 90 и 40% соответственно. Тем не менее, ни в одном варианте опыта ЦГ и ХФ не оказывали сколько-нибудь заметного влияния на величину $T_{0,5}$ (табл. 1,2). В случае LT_{50} сходная картина наблюдалась только у проростков, получавших наряду с ЦГ или ХФ и мивал.

Из полученных результатов следует, что модифицирующее влияние мивала в отношении показателей $T_{0,5}$ и LT_{50} не связано с процессами биосинтеза белка и отражает, по-видимому, активацию иных адаптивных механизмов.

3. Влияние локальной модификации структуры и функции мембран ФСА на их термостабильность при тепловой адаптации растений

Установлено, что предобработка проростков пшеницы соединениями, блокирующими транспорт электронов в хлоропластах (ДХМ, АА) и митохондриях (АА) не оказывала заметного влияния на уровень термостабильности ФСА, достигаемый при 40° (рис. 7А). Вместе с тем, оба вещества существенно снижали способность клеток к тепловой адаптации.

Таблица 1

Влияние мивала и ингибиторов биосинтеза белка на термостабильность мембран ФСА ($T_{0,5}$) и теплоустойчивость клеток листа (LT_{50}) пшеницы при 25°

Варианты	Теплоустойчивость, $^{\circ}C$	
	$T_{0,5}$	LT_{50}
Контроль (исходный уровень)	$42,7 \pm 0,5$	$50,8 \pm 0,03$
Мивал	$45,3 \pm 0,6$	$57,7 \pm 0,11$
Циклогексимид	$42,5 \pm 0,4$	$51,0 \pm 0,03$
Хлорамфеникол	$42,4 \pm 0,5$	$50,9 \pm 0,11$
Мивал + циклогексимид	$45,1 \pm 0,6$	$57,6 \pm 0,15$
Мивал + хлорамфеникол	$45,0 \pm 0,4$	$56,4 \pm 0,17$

Таблица 2

Влияние мивала и ингибиторов биосинтеза белка на термостабильность мембран ФСА ($T_{0,5}$) и теплоустойчивость клеток листа (LT_{50}) пшеницы при 40°

Варианты	Теплоустойчивость, $^{\circ}C$	
	$T_{0,5}$	LT_{50}
Контроль (закалка на воде)	$49,0 \pm 0,3$	$58,1 \pm 0,11$
Закалка + мивал	$49,8 \pm 0,5$	$58,6 \pm 0,08$
Закалка + циклогексимид	$48,3 \pm 0,3$	$51,7 \pm 0,08$
Закалка + хлорамфеникол	$49,5 \pm 0,3$	$55,2 \pm 0,09$
Закалка + мивал + циклогексимид	$49,2 \pm 0,2$	$57,6 \pm 0,13$
Закалка + мивал + хлорамфеникол	$49,5 \pm 0,3$	$58,3 \pm 0,06$

Причем величина эффекта зависела от того, вводили их на свету или в темноте, по отдельности, или в смеси друг с другом (рис. 7Б). Кроме того, темнота заметно препятствовала росту LT_{50} при 40° . По-видимому, сдвиги $T_{0,5}$, в отличие от теплоустойчивости клеток, не сопряжены непосредственно с транспортом электронов в мембранах клеточных органелл.

4. Влияние теплового закаливания растений на функциональные свойства РДФК/О

Опыты показали, что активность РДФК/О, определяемая в гомогенате листьев, у адаптированных к теплу проростков огурца была несколько

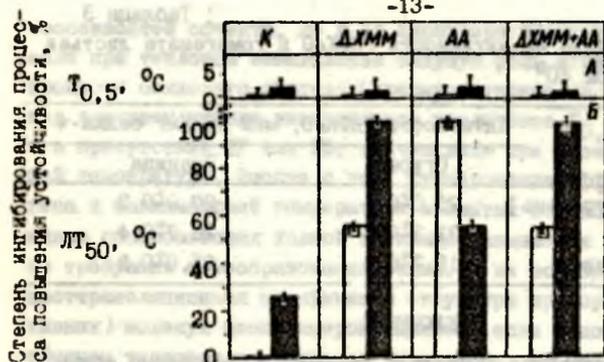


Рис. 7. Влияние диурона (ДХМ) и антимицина А (АА) на термостабильность мембран ФСА (А) и теплоустойчивость клеток листа (Б) пшеницы при 40° на свету (□) и в темноте (■).

ко выше, чем у неадаптированных (табл. 3). Закалка в присутствии ХФ устраняла данный эффект. Сходная картина наблюдалась и у пшеницы, хотя различия между вариантами были меньше, чем у огурца.

Динамику удельной активности фермента изучали на очищенном препарате РДФК/О пшеницы. Оказалось, что поведение карбоксилазной и оксигеназной функций, независимо от температуры выращивания, описывалось одновершинной кривой. В то же время, максимальные значения карбоксилазной активности у закаленных проростков были несколько ниже, чем у незакаленных. Реакция оксигеназной функции на смену температурных режимов была выражена менее отчетливо.

Подтверждением того, что какие-либо изомимные замещения не причастны к изменению активности РДФК/О, служат результаты электрофоретического анализа. Независимо от степени очистки препарата, спектр фермента был представлен только одной полосой, относительная электрофоретическая подвижность которой варьировала незначительно.

Таким образом, различия в функциональных свойствах РДФК/О у неадаптированных и адаптированных к теплу проростков отражают, по-видимому, влияние температурного фактора на структуру исследуемого белка. Вместе с тем, особенности динамики удельной активности фермента указывают на то, что в основе этого феномена могут лежать индуцированные температурой изменения эндогенного уровня метаболитов-эффекторов.

Таблица 3

Влияние хлорамфеникола на активность РДФК/О в гомогенате листьев огурца и пшеницы при 40°

Варианты	Активность РДФК/О, мкм CO_2 /мг белка·ч	
	Огурец	Пшеница
Контроль (исходный уровень)	25,0±0,4	27,0±0,3
Закалка	31,3±0,6	29,7±0,4
Закалка + хлорамфеникол	10,3±0,1	25,0±0,3

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволили установить некоторые общие закономерности варьирования термостабильности мембран ФСА у холодостойкого (озимая пшеница) и теплолюбивого (огурец) видов растений в процессе их тепловой адаптации.

Один из использованных нами приемов заключался в сравнительном анализе особенностей динамики показателей $T_{0,5}$ и $ЛТ_{50}$ при высокой закалывающей температуре, либо при чередовании режимов теплового и холодового закалывания. Установлено, что повышение термостабильности мембран ФСА при 40° у обоих объектов происходило с большей скоростью, чем рост теплоустойчивости клеток. В условиях гипотермии теплоустойчивость исследуемых структур вела себя иначе: увеличение ее, наблюдавшееся в начальный период охлаждения (2-3 сут), затем сменялось спадом. Однако максимальный прирост $ЛТ_{50}$, равно как и последующее снижение этого показателя до исходного уровня, достигалось уже несколько раньше, чем в случае $T_{0,5}$. Все эти данные свидетельствуют, на наш взгляд, о функциональной автономности механизмов, ответственных за изменение указанных показателей при действии на растения неблагоприятных температур.

Дополнительные доказательства в пользу подобного заключения были получены в опытах с применением ингибиторов белкового (ЦГ, ХФ, АКТ) и энергетического (ДХММ, АА) обмена. Все использованные соединения эффективно блокировали повышение клеточной устойчивости при закалывании растений, однако значения $T_{0,5}$ у проростков контрольного (закалка без обработок) и опытного (закалка с ингибиторами) вариантов были практически одинаковыми.

Необходимо отметить, что вклад различных механизмов в общий адаптивный потенциал клеток может заметно варьировать (Браун, Моженко, 1987; Хученко, 1988). Последнее зависит не только от биологических

особенностей объекта, но и от характера внешних воздействий. Так, если при тепловом закаливании ведущую роль играют, судя по всему, процессы белкового синтеза (преимущественно на 80S рибосомах), то под влиянием мивала значительное увеличение $T_{0,5}$ и LT_{50} отмечалось и в присутствии ЦГ или ХФ, причем даже при физиологически нормальной температуре. Вместе с тем, суммирование эффектов этого адаптогена и закаливающей температуры в опытах не наблюдалось. Очевидно, мивал способствовал полной активации комплекса адаптивных реакций, не требующих новообразования белка. В их основе, по-видимому, лежит посттрансляционная модификация структуры прецедствующих (конститутивных) молекул биополимеров. Причем, если подобный механизм при обычном тепловом закаливании характерен, на наш взгляд, преимущественно для высокомолекулярных, или наиболее массовых белков (Титов, Филимонов, 1986), то в присутствии мивала действие его распространяется уже на весь белковый комплекс растительной клетки.

Заметное влияние тепловая адаптация оказывала и на другой важный компонент фотосинтетического аппарата - РДФК/О. Однако направленность сдвигов ее активности в значительной мере зависела от степени очистки препарата. Существенно и другое обстоятельство: изозимный спектр фермента во всех вариантах опыта был представлен только одной полосой, относительная электрофоретическая подвижность которой варьировала слабо. С учетом этих, а также имеющихся в литературе данных можно предположить, что в основе наблюдаемых под влиянием высокой закаливающей температуры изменений функциональных свойств РДФК/О лежит связывание с молекулой фермента эндогенных регуляторов, синтез которых, вероятно, происходит при участии 70S рибосом хлоропластов.

Таким образом, проведенные исследования показали, что тепловая адаптация растений представляет собой сложный кооперативный процесс, объединяющий целый комплекс реакций. При этом рост теплоустойчивости клеток в значительной мере обусловлен синтезом белка на цитоплазматических 80S рибосомах. Напротив, повышение термостабильности и модификация функциональных свойств основных компонентов ФСА связаны с влиянием температурного фактора на их структуру. По всей видимости, важную роль в этом случае играют также терминдуцированные изменения уровня эндогенных эффекторов.

ВЫВОДЫ

1. Тепловое закаливание растений сопровождается увеличением термостабильности компонентов фотосинтетических мембран. Причем ее по-

вышение у обоих изученных видов (пшеница, огурец) происходит в опережающем рост теплоустойчивости клеток темпе.

2. При тепловом закаливании растений ингибиторы белкового синтеза (ЦГ, ХФ, АКТ) не оказывают влияния на термостабильность фотосинтетических мембран, но препятствуют увеличению теплоустойчивости клеток. Очевидно, в основе термоиндуцированных сдвигов термостабильности мембран ФСА лежит модификация структуры конститутивных элементов, тогда как рост теплоустойчивости клеток обусловлен синтезом стрессовых белков.

3. Обработка незакаленных растений мивалом приводит к заметному увеличению термостабильности компонентов мембран ФСА и клеток листа при 25°. Существенно, что указанный процесс протекает и в присутствии ингибиторов трансляции - циклогексимида и хлорамфеникола.

4. Предобработка растений ингибиторами электронного транспорта (ДХММ, АА) блокирует тепловую адаптацию клеток, но не препятствует повышению термостабильности компонентов ФСА, наблюдаемому при высокой закалывающей температуре.

5. У закаленных к теплу растений активность РДФК/О в смеси легко-растворимых белков выше, а в очищенном препарате - ниже, чем у незакаленных. По-видимому, указанные различия отражают изменения эндогенного уровня регуляторных соединений, индуцированные закалкой.

6. Предполагается, что тепловое закалывание растений представляет собой сложный кооперативный процесс, включающий, с одной стороны, синтез стрессовых белков, а с другой - модификацию конститутивных элементов клетки и, в частности, компонентов ФСА.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Филимонов А.А. Влияние температуры на структуру и функцию РДФ-карбоксилазы-оксигеназы. - В кн.: Терморезистентность и продуктивность сельскохозяйственных растений. Петрозаводск, изд-е Карельского филиала АН СССР, 1984, с. 12-23.

2. Филимонов А.А. Особенности РДФ-карбоксилазы-оксигеназы при холодном и тепловом закалывании растений. - В кн.: Многолет. травы. Вопр. селекции и агрономии. Петрозаводск, изд-е Карельского филиала АН СССР, 1985, с. 130-136.

3. Титов А.Ф., Филимонов А.А. Роль белков в температурной адаптации активно вегетирующих растений: аддитивность молекулярного и молекулярно-генетического механизмов. - Тез. докл. XI Всес. симп. "Биологические проблемы Севера". Ч.2. "Ботаника, физиология и биохимия растений, кормопроизводство". Якутск, 1986, с. 133-134.

4. Филимонов А.А., Виrolайнен В.А. Термоадаптация фотосинтетического аппарата у растений пшеницы на свету и в темноте.- Тез. докл. 7 конф. мол. ученых-биологов "Изучение, рациональное использование и охрана природных ресурсов". Рига, 1987, с. 104-106.

5. Шерудило Е.Г., Филимонов А.А., Виrolайнен В.А. Влияние мивала на теплоустойчивость проростков пшеницы.- Тез. докл. мол. ученых "Изучение, охрана и рациональное использование природных ресурсов". Уфа, 1987, с. 142.

6. Филимонов А.А., Виrolайнен В.А., Балагурова Н.И. Влияние гипотермии на термостабильность фотосинтетических мембран и теплоустойчивость клеток листа пшеницы.- Тез. докл. Межд. конф. "Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины". Харьков, 1988, с. 38.

7. Филимонов А.А., Виrolайнен В.А., Таланова В.В. Влияние теплового закалывания на теплоустойчивость мембран фотосинтетического аппарата и клеток листа растений.- Тез. докл. III Всес. конф. мол. ученых по физиологии растительной клетки. Петрозаводск, 1988, с. 126.

8. Филимонов А.А., Любимов В.Ю. Влияние теплового закалывания растений на функциональные свойства РДФ-карбоксилазы/оксигеназы.- Там же, с. 127.

9. Филимонов А.А., Виrolайнен В.А., Шерудило Е.Г. Модификация уровня теплоустойчивости проростков пшеницы ингибиторами энергетического обмена.- Там же, с. 128.

10. Филимонов А.А., Виrolайнен В.А., Шерудило Е.Г., Титов А.Ф. Модификация уровня теплоустойчивости проростков пшеницы мивалом.- Материалы к науч.-практ. конф. "Биологически активные вещества в сельском хозяйстве". Экспресс-информация № 6-87. Ленинград, 1988, с. 12-13.

11. Виrolайнен В.А., Таланова В.В., Филимонов А.А. Сравнительная оценка теплоустойчивости растений по температурной зависимости замедленной флуоресценции хлорофилла и температуре гибели клеток листа.- В кн.: Влияние факторов среды и физиологически активных веществ на продуктивность и устойчивость растений, Петрозаводск, изд-е Карельского филиала АН СССР, 1989, с. 124-128.

12. Филимонов А.А., Виrolайнен В.А. Увеличение термостабильности мембран хлоропластов при тепловой адаптации растений пшеницы.- Там же, с. 73-80.

13. Filimonov A.A., Virolaynen V.A. The possible role of nonspecific reactions in thermoadaptation of plant photosynthetic apparatus.- In: Plant Metabolism Regulation, Sofia, 1987, p. 144-146.

