

УДК 58.04:546.47/56:581.174

ДЕЙСТВИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ И АКТИВНОСТЬ КАРБОНГИДРАЗЫ ХЛОРОПЛАСТОВ ГОРОХА

**© 2013 г. М. В. Водка, А. В. Полищук,
Н. А. Белявская, Е. К. Золотарёва**

*Институт ботаники им. Н.Г. Холодного
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)*

Исследовали влияние тяжелых металлов (ионов Cu^{2+} и Zn^{2+}) на структуру и функциональные показатели фотосинтетического аппарата листьев гороха. После обработки листьев гороха 80 мкМ Cu^{2+} или 200 мкМ Zn^{2+} наблюдалось изменение строения гран, неоднородность упаковки тилакоидов в гранах, что проявлялось в увеличении межтилакоидных промежутков и толщины гранальных тилакоидов по сравнению с контролем. В то же время скорость электронного транспорта от воды к метилвиолгону, максимальный квантовый выход и фотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла (F_v/F_m , qP), в листьях и хлоропластах гороха, обработанных Cu^{2+} , изменялись лишь незначительно. Подобные эффекты зарегистрированы также после обработки листьев и хлоропластов 200 мкМ Zn^{2+} за исключением того, что параметр qP в этом случае снижался по сравнению с контролем на 20%. Данные работы позволяют предполагать, что структурные изменения в системе тилакоидных мембран вызваны снижением уровня связанного бикарбоната, количество которого в присутствии ионов меди и цинка уменьшалось на 16 и 20%, соответственно. В условиях экспериментов 80 мкМ Cu^{2+} и 200 мкМ Zn^{2+} подавляли активность хлоропластной карбоангидразы на 70%, что, возможно, и приводило к частичной потере мембраносвязанного бикарбоната.

Ключевые слова: *Pisum sativum L., тилакоиды, граны, тяжелые металлы, ингибиторы, карбоангидраза, бикарбонат, хлоропласты, фотосинтетический аппарат*

Усиливающееся техногенное загрязнение окружающей среды стимулирует интерес к изучению токсического действия тяжелых металлов (ТМ), представляющих серьезную угрозу для живых организмов, а также к выявлению механизмов защиты от их токсического действия.

В соответствии с классификацией Н. Реймерса, тяжелыми считаются металлы с плотностью более 8 г/см³, в частности, Pb, Cu, Zn, Ni, Cd, Co, Sb, Sn, Bi и Hg (Никитин, 2000). Такие металлы как железо, медь, цинк, никель, кобальт, молибден, участвуют в биологических процессах и в микроколичествах необходимы для жизнедеятельности растений. Однако при

возрастании их содержания в воде и почве многие биохимические процессы и физиологические функции в растениях и водорослях нарушаются, ингибируется синтез ряда биологически активных соединений: ферментов, витаминов, пигментов и др. Растения в условиях загрязнения почвы или воды накапливают ТМ часто до токсичного уровня в тканях корней или стеблях, что приводит к подавлению процессов роста и размножения. Большинство металлов поступает в клетку в форме катионов (например, Zn^{2+} , Cu^{2+}) в результате простой диффузии, а также с помощью специальных транспортных систем (Bertrand, Poirier, 2005): АТФ-аз СРх-типа, переносящих эссенциальные и неэссенциальные металлы через плазматическую мембрану; катион/ H^+ антипортеров; транспортных белков семейств Nramp (natural resistance associated macrophage proteins) (Techau, 2007) и CDF (cation diffusion facilitators),

Адрес для корреспонденции: Водка Марина Валерьевна, Институт ботаники им. Н.Г.Холодного НАН Украины, ул. Терещенковская, 2, г. Киев, 01601, Украина; e-mail: marinavodka@yandex.ru

участвующих в переносе ионов Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} и Cd^{2+} , а также белков семейства ZIP, транспортирующих ионы Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} и Zn^{2+} (Pedas, Husted, 2009). Эти белки-транспортеры найдены в мембранах вакуолей и оболочках хлоропластов (Ferro et al., 2003; Bertrand, Poirier, 2005). Повышенное содержание ТМ вызывает резкое увеличение проницаемости плазмалеммы и, следовательно, ионный дисбаланс, приводит к потере тургора и угнетению клеточного метаболизма (Bertrand, Poirier, 2005). Механизмы защиты клеток от избытка ТМ изучены фрагментарно и включают в себя адсорбцию ТМ внутренними и внешними энтеросорбентами, вакуолярную компартментализацию, активацию транспортеров, обеспечивающих вынос ТМ из клеток, индукцию синтеза белков-шаперонов (Hall, 2002).

По литературным данным (Кабата-Пендиас, Пендиас, 1989), токсическое действие меди начинает проявляться, если ее содержание в листьях превышает 15–20 ppm, а токсическое действие цинка – при концентрации более 150–500 ppm.

Избыточные количества ионов цинка и меди прямо и косвенно влияют на фотосинтетические процессы, ингибируя их. Прямое действие связано с подавлением активности ферментов синтеза хлорофилла и цикла Кальвина из-за связывания Me^{2+} с SH-группами ферментов, нарушения переноса электронов по электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), изменения количества тилакоидов и липидного состава мембран. Опосредованное влияние обусловлено индуцированным металлами водным стрессом, закрытием устьиц, в результате чего уменьшается количество доступного CO_2 (Van Assche, Clijsters, 1986; Титов и др., 2007).

Согласно литературным данным, ионы Cu^{2+} ингибируют как донорную, так и акцепторную стороны ФСII. На донорной стороне Cu^{2+} подавляет электронный транспорт на уровне первичного донора электронов P680, а также на уровне окисления $TyrZ$ (Schröder, 1994, Jegerschöld, 1995). Как показано в работе Burda (2003), обе формы цитохрома b559 и хлорофилл Z являются мишенями для действия ионов меди. Cu^{2+} на акцепторной стороне ФСII взаимодействует с первичным хиноновым акцептором QA (Jegerschöld, 1995), замещает негемовое железо на участке феофитин (Phe)-QA-Fe (Singh, 1987, Jegerschöld, 1999), а также реагирует со вторичным хиноновым акцептором QB (Mohanti, 1989).

Действие ионов меди и цинка на фотохимические процессы в хлоропластах зависит от концентрации ТМ. Невысокие концентрации Cu^{2+} и Zn^{2+} не ингибируют электронного переноса по полной электрон-транспортной цепи (Tripathy, Mohanty, 1989), а ионы Cu^{2+} даже стимулируют электронный транспорт на уровне ФСII (Burda, 2003; Поліщук, Топчий, 2009). Ранее нам удалось показать, что ионы Cu^{2+} (Подорванов и др., 2007) и Zn^{2+} (Поліщук та ін. 2007) ингибируют светозависимое поглощение протонов на уровне вторичного хинонового акцептора QB в значительно большей степени, чем фотосинтетическое выделение кислорода. Величина светозависимого поглощения протонов зависит от содержания мембраносвязанного бикарбоната в тилакоидах, а также от его концентрации в суспензии хлоропластов (Золотарева, 2009).

В тилакоидах обнаружено, по крайней мере, два пула связанного бикарбоната: прочно связанный (один ион HCO_3^- на 400-600 молекул хлорофилла), контролирующей фотохимическую активность фотосистемы II (ФС II), и слабо связанный (один ион HCO_3^- на 1 молекулу хлорофилла), который может быть удален без существенного влияния на фотохимическую активность ФС II (Stemler, 1977; Varanov et al., 2000). После полного удаления прочно связанного бикарбоната процесс фотосинтетического выделения кислорода практически полностью подавляется не только в хлоропластах, но и в субхлоропластных фрагментах, содержащих только фотосистему II, отвечающую за процесс окисления воды и выделения кислорода. (Stemler, 2002). Предполагается, что функциональная роль слабо связанного бикарбоната в тилакоидах состоит в облегчении переноса протонов от центров их образования к АТФ-синтазе (Золотарева, 2009). Скорость фотохимических реакций, связанных с переносом протонов, контролируются в хлоропластах карбоангидразой (КА) (Онойко и др., 2010), обеспечивающей многократное ускорение взаимного обмена форм угольной кислоты. КА присутствует во множестве форм в тканях растений (Иванов и др., 2007).

Среди растительных КА наименее изученной остаются стромальные и тилакоидные формы фермента, локализованные на внутренних мембранах хлоропластов клеток мезофилла листа (Rudenko et al., 2007). Хотя известно, что активность КА из различных источников эффективно подавляется ионами ТМ (Lionetto et al., 2012), их влияние на КА растений до на-

ДЕЙСТВИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

стоящего времени систематически не исследовалось. Если ТМ (медь и цинк) являются ингибиторами мембранной карбоангидразы, можно ожидать, что в их присутствии разрушается пул мембраносвязанного бикарбоната и изменяется ультраструктурная организация тилакоидной системы. Целью настоящей работы была проверка этого предположения.

МЕТОДИКА

В опытах использовали листья 14-суточных проростков *Pisum sativum* L. (сорт Уладовский 10). Срезанные листовые пластинки гороха погружали в чашки Петри, наполненные дистиллятом, 250 мкМ CuSO_4 или 400 мкМ ZnCl_2 на 2,5 суток при температуре 22°C и освещенности 15 мкмоль квантов/м²·с.

Карбоангидразную активность листьев и хлоропластов гороха оценивали по скорости выделения CO_2 в реакции дегидратации бикарбоната натрия. Скорость реакции регистрировали непосредственно по скорости изменения потока CO_2 через инфракрасный газоанализатор и без дополнительных расчетов.

Для определения изменений содержания связанного бикарбоната суспензию хлоропластов гороха с концентрацией хлорофилла 4 мг/мл инкубировали в течение 3 ч при 0°C в присутствии ионов тяжелых металлов (80 мкМ Cu^{2+} , 200 мкМ Zn^{2+}).

Содержание бикарбоната в суспензии хлоропластов и супернатанте, образованном после осаждения хлоропластов, определяли с помощью инфракрасного газоанализатора Q-S151 ("Qubit systems", Канада) по количеству CO_2 , выделяющемуся после внесения 0,3 М HCl .

Для контроля функционального состояния хлоропластов и степени действия ингибиторов на фотосинтетический аппарат определяли параметры флуоресценции хлорофилла (F_v/F_m , qP) при интенсивности действующего света 500 мкмоль квантов/(м²·с). F_v/F_m – максимальный квантовый выход фотохимических реакций ФС II, qP – фотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла (van Kooten, Snel, 1990).

Ультраструктурные изменения хлоропластов листьев гороха под воздействием ТМ определяли методом трансмиссионной электронной микроскопии.

Из средней части срезанных листьев, которые были обработаны растворами ингибито-

ров КА или дистиллятом, вырезали фрагменты длиной 2-3 мм. Предварительная фиксация проводилась при вакуумной инфльтрации образцов в 2,5 % глутаровом альдегиде на 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,2) при комнатной температуре, а затем образцы оставляли в свежем растворе того же фиксатора на 4 ч при 4°C. После промывки в том же буфере (2 раза по 20 мин) осуществляли постфиксацию материала раствором 1% OsO_4 на 0,1 М какодилатном буфере (pH 7,2) в течение ночи при 4°C. Обезживание проводили, обрабатывая пробы в этаноле возрастающей концентрации и пропиленоксиде. После этого материал пропитывали в смесях эпоксидных смол и пропиленоксида, заливали в эпон-аралдитную смолу и переносили в термостат для полимеризации при 37 и 60°C.

Ультратонкие срезы клеток получали с помощью ультрамикротомы LKB-V (LKB, Швеция), снимали на однощелевые бленды, покрытые напыленной углем формваровой пленкой, затем контрастировали 1 % раствором уранилацетата в течение 1 ч в темноте и раствором цитрата свинца течение 3-5 мин.

Препараты исследовали и фотографировали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1300 (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Изображение срезов препаратов заснимали на пленку для электронной микроскопии типа EB19H (AGFA, Бельгия).

Для морфометрического анализа фотографии хлоропластов и их фрагментов сканировали на сканере Epson Perfection 3200 Photo scanner. Определение поперечных размеров тилакоидов гран и межтилакоидных промежутков на изображениях хлоропластов проводили с помощью компьютерной программы ImageTool 3.0 (UTHSCSA, США). Фотографии готовили, используя компьютерные программы Adobe Photoshop 7.0 и Corel Photo-Paint 11.

Для каждого варианта опыта и контроля анализировали по 30-39 гран тилакоидов, снятых при увеличении $\times 10000$, 15000, или 100000. Достоверность разницы средних значений между опытными и контрольными вариантами оценивали с помощью t -критерия Стьюдента. Разницу считали статистически достоверной при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что ионы тяжелых металлов, в частности, ионы цинка и меди ингибируют активность карбоангидразы у различных орга-

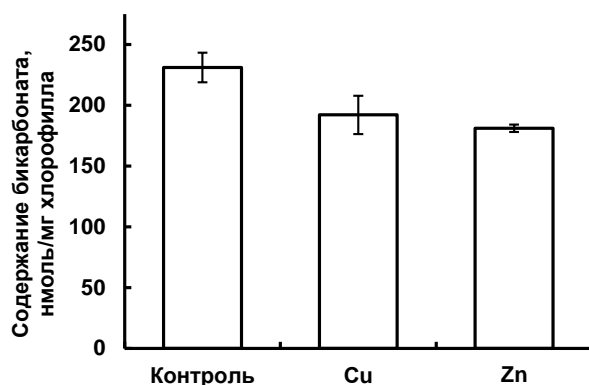


Рис. 1. Влияние ингибиторов карбоангидразы на содержание бикарбоната в выделенных хлоропластах гороха.

низмов (Lionetto et al., 2012). Имеются лишь фрагментарные сведения о влиянии ТМ на активность растительных карбоангидраз (Lu et al., 2005). Мы исследовали действие возрастающих концентраций $ZnCl_2$ и $CuSO_4$ на активность КА изолированных хлоропластов гороха в реакции дегидратации бикарбоната. По мере возрастания содержания ионов Cu^{2+} или Zn^{2+} скорость образования CO_2 в реакции $HCO_3^- + H^+ \rightarrow H_2O + CO_2$ снижалась (табл. 1). Ионы меди оказались более эффективными ингибиторами КА, чем ионы цинка. Данные, приведенные в табл. 1, позволяют оценить величину концентрации металлов, вызывающих полумаксимальное ингибирование I(50) карбоангидразной активности – около 40 мкМ для ионов меди и около 100 мкМ для ионов цинка. Эти результаты согласуются с данными, полученными при изучении ингибирования КА активности тяжелыми металлами в тканях животных организмов (Lionetto et al., 2012) Существенно, что в диапазоне концентраций 20-200 мкМ ионы исследованных металлов практически не влияли на скорость поглощения кислорода в фотохимической реакции $H_2O \rightarrow MB$. Ранее было показано, что ионы меди вплоть до концентрации 200 мкМ

(Поліщук та ін., 2007) и ионы цинка вплоть до концентрации 500 мкМ (Подорванов и др., 2007) ингибировали скорость этой фотохимической реакции лишь незначительно.

На рис. 1 приведены результаты исследования влияния ионов меди и цинка на количество мембраносвязанного бикарбоната в изолированных тилакоидах. Видно, что в контроле содержание бикарбоната составило 230 нмоль/мг хлорофилла, что в молярном соотношении соответствует одной молекуле бикарбоната на каждые пять молекул хлорофилла. В присутствии 80 мкМ Cu^{2+} наблюдалось его снижение на 16%, а после обработки изолированных тилакоидов 200 мкМ Zn^{2+} содержание бикарбоната снижалось на 20%. Эти изменения, возможно, связаны с подавлением КА активности тилакоидов ионами ТМ.

Активность фотохимических процессов в листьях гороха после обработки их ионами меди и цинка оценивали методом индукции флуоресценции хлорофилла, определяя в первую очередь F_v/F_m – максимальный потенциальный квантовый выход ФС II – параметр, являющийся показателем уровня стресса у растения и

Таблица 1. Влияние тяжелых металлов на скорость реакций, катализируемых КА в изолированных хлоропластах гороха

Ион металла	Концентрация, мкМ	Скорость реакции дегидратации, % от контроля
Cu^{2+}	20	72 ± 5
	50	42 ± 5
	100	25 ± 3
Zn^{2+}	50	67 ± 8
	100	45 ± 4
	200	28 ± 4

Примечание. Скорость реакции дегидратации бикарбоната составляла в контроле 400-600 мкмоль CO_2 /ч·мг хл.

ДЕЙСТВИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

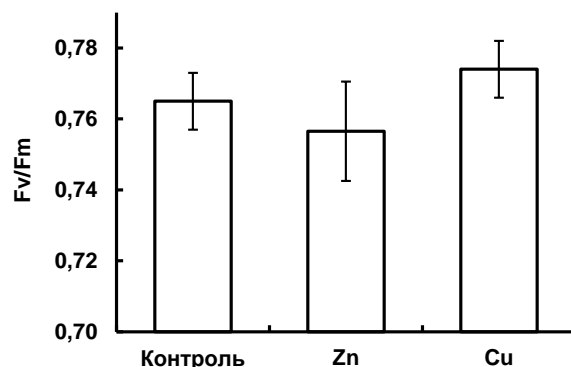


Рис. 2. Максимальный потенциальный квантовый выход ФС II (F_v/F_m) в присутствии ТМ.

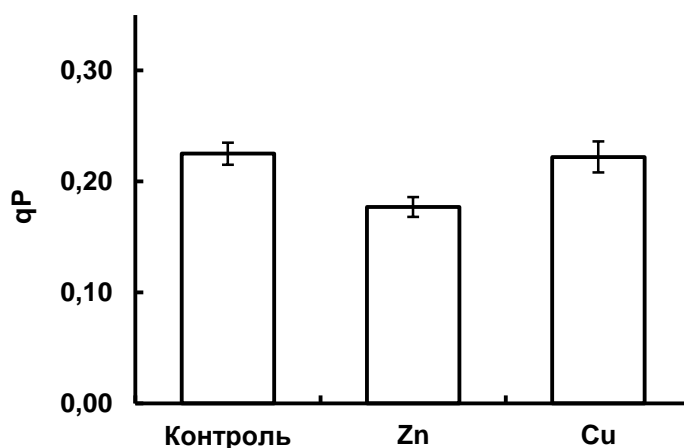


Рис. 3. Фотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a* (qP) в присутствии ТМ.

снижающийся при возрастании дефектов в комплексах ФС II, а также при активации механизмов нефотохимического преобразования энергии света. У большинства фотосинтезирующих эукариотических организмов этот показатель в норме находится в пределах 0,75-0,85 и снижается при различных стрессовых воздействиях (Bjorkman, Demmig-Adams, 1995; Schreiber, et al., 1995).

В нашем эксперименте величина максимального потенциального квантового выхода ФС II составляла 0,75. В присутствии ионов меди или цинка, ингибирующих активность КА, значительных изменений в величине максимального квантового выхода (рис. 2) не отмечалось, что свидетельствует об отсутствии существенного влияния условий эксперимента на процессы преобразования световой энергии в хлоропластах.

В этих же экспериментах величина фотохимического тушения qP – параметра, характеризующего эффективность использования энергии света и пропускную способность фотосинтетической электрон-транспортной цепи – в присутствии Zn^{2+} понижалась на 22%, тогда как в присутствии ионов меди она практически не

изменялась (рис. 3). Таким образом, действие Cu^{2+} на функционирование ЭТЦ в условиях эксперимента не проявилось.

Снижение пропускающей способности ЭТЦ в присутствии ионов цинка может быть вызвано как ингибированием Рубиско (Van Assche, Clijsters, 1986), так и лимитированием по терминальному акцептору электронов вследствие многократного замедления процессов взаимоконвертации форм угольной кислоты в хлоропласте из-за подавления активности КА.

На рис. 4 представлены электронные микрофотографии срезов фрагментов хлоропластов гороха. В образцах листьев контрольного варианта (рис. 4а) четко выделяются отдельные граны, пластоглобулы, тилакоиды стромы. При большом увеличении видна интактная грана, которая состоит из 42 тилакоидов, от концевых участков которых отходят тилакоиды стромы (рис. 4б).

Под действием Cu^{2+} , как видно из рис. 4 (в, г), толщина тилакоидов гран и ширина межтилакоидных промежутков увеличивалась при сохранении общей структуры гран и равномерной упаковки тилакоидов в гранах. Результаты

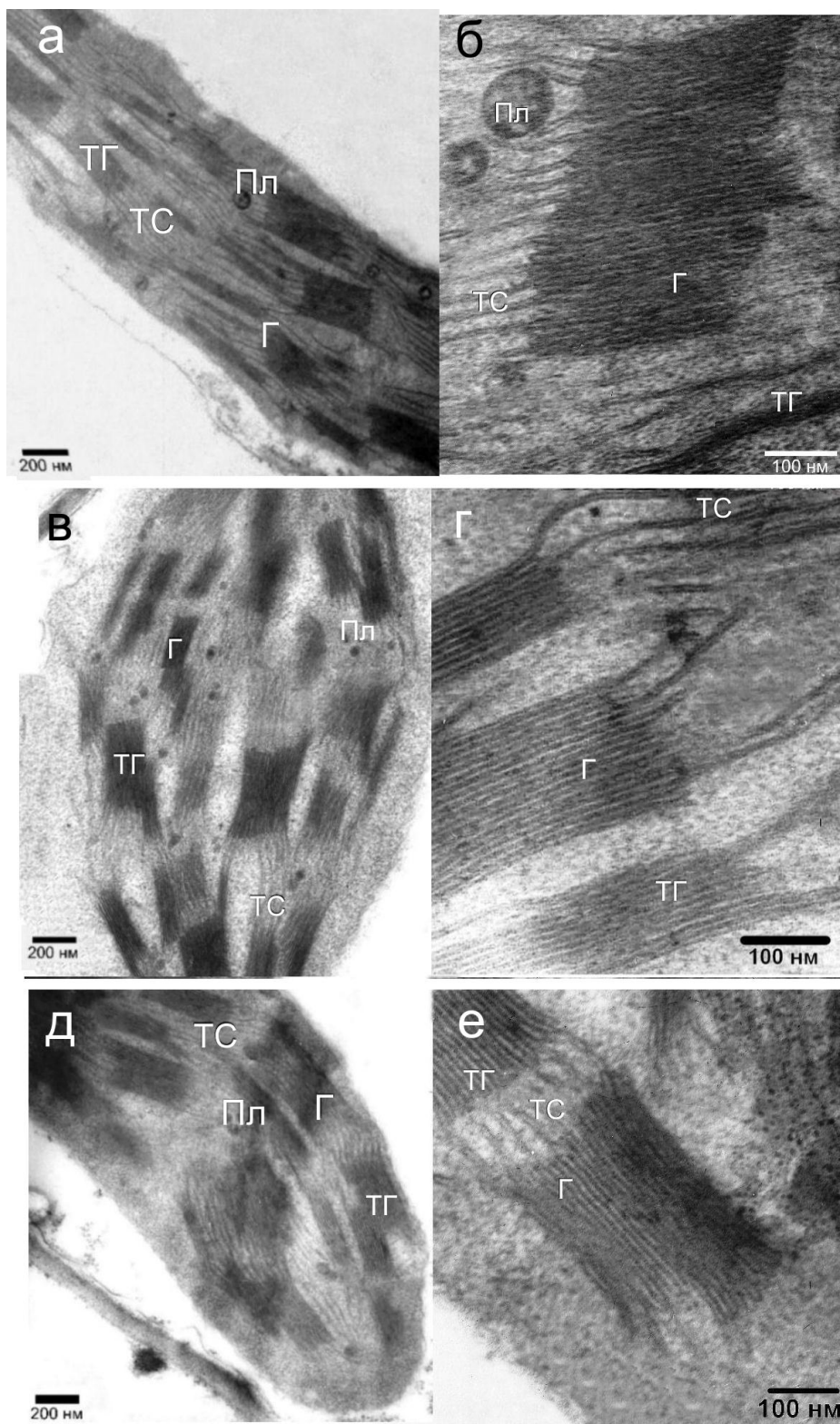


Рис. 4. Ультраструктура листьев гороха. Контроль (а, б); обработка Cu^{2+} (в, г) и Zn^{2+} (д, е).
Сокращения: Г – грана, Пл – пластоглобула, ТГ – тилакоиды грани, ТС – тилакоиды стромы.

морфометрического анализа ультраструктурных данных приведены в табл. 2.

После обработки хлоропластов ионами Zn^{2+} (рис. 4, д, е) наблюдалась неоднородность

упаковки тилакоидов гран, изменение строения гран, что проявлялось в расширении межтилакоидных промежутков (табл. 2), толщина тилакоидов гран также увеличивалась по сравнению с контролем (табл. 2).

ДЕЙСТВИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Таблица 2. Влияние ионов меди и цинка на размеры тилакоидов в гранах хлоропластов гороха

Вариант	Контроль	80 мкМ Cu ²⁺	200 мкМ Zn ²⁺
Толщина тилакоидов, нм	4,7±0,55 ^a	5,21±0,55 ^b	8,46±0,86 ^b
Ширина межтилакоидных промежутков, нм	3,12±0,50 ^a	3,43±0,23 ^b	4,37±0,69 ^b

Примечание. Разными буквами указаны величины, достоверно различающиеся при $P \leq 0,05$.

В настоящей работе для экспериментов использовали как изолированные хлоропласты (табл. 1, рис. 1), так и целые листья (рис. 3, 4, табл. 2). Если учесть, что растительные клетки и органы содержат множественные формы карбоангидраз, а в транспорте CO₂ участвуют различные типы мембран, изучение влияния ТМ на карбоангидразную активность и содержание связанного бикарбоната в изолированных тилакоидах позволяет прийти к конкретному выводу об их вкладе в эти процессы. Наши данные показали, что ионы ТМ ингибируют карбоангидразу тилакоидов на 50% в присутствии 40 мкМ меди или 100 мкМ цинка. После внесения в суспензию тилакоидов 80 мкМ меди и 200 мкМ цинка КА активность подавлялась приблизительно на 70%, а содержание мембраносвязанного бикарбоната в тилакоидах уменьшалось на 55±2 мкмоль/мг хл в присутствии цинка и на 40±15 мкмоль/мг хл в присутствии меди. Причиной наблюдаемой потери мембранами связанного бикарбоната является, как мы предполагаем, инактивация КА, обеспечивающей быстрый взаимный переход форм угольной кислоты. В органеллах сдвиг равновесия в реакции $\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ при неактивной КА может происходить за счет поглощения образовавшегося CO₂ липидным матриксом мембраны вследствие того, что, как показывают модельные эксперименты, CO₂ лучше растворим в липидах, чем в водных средах (Gutknecht, 1987).

При изучении влияния ТМ на ультраструктуру хлоропластов листья гороха погружали на 2,5 суток в раствор солей меди или цинка той же концентрации, что и в экспериментах с изолированными хлоропластами. Следует отметить, что как в экспериментах с изолированными хлоропластами, так и при изучении влияния ТМ на листьях воздействие металлов было непродолжительным и приводило к значительным повреждениям фотосинтетического аппарата. Об этом свидетельствует неизменность скорости светозависимого восстановления метилвиологена в реакции $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MV}$ изолированными хлоропластами и результаты, полученные методом модулированной флуо-

ресценции хлорофилла (рис. 2 и 3). Максимальный потенциальный квантовый выход ФС II (F_v/F_m) практически не изменялся в листьях после экспозиции в присутствии ТМ. Величина фотохимического тушения флуоресценции qP также оставалась неизменной после инкубации листьев в присутствии ионов меди, тогда как после обработки раствором хлорида цинка величина qP несколько снижалась.

Результаты изучения влияния ТМ на ультраструктуру хлоропластов показали, что в присутствии как ионов меди, так и ионов цинка, наблюдается расширение тилакоидов и межтилакоидных промежутков. Эффект цинка оказался более выраженным, чем эффект меди, также как и в экспериментах по изучению влияния ТМ на фотохимическую активность (рис. 3). Изменение размеров тилакоидов и гран в обработанных ионами Me²⁺ листьях при незначительной, судя по данным индукции флуоресценции хлорофилла, вариации их физиологического состояния может быть связано с потерей мембраносвязанного бикарбоната и накоплением CO₂ в мембране. Поскольку размер пула мембраносвязанного бикарбоната велик (Stamler, 1977, Baranov et al., 2000) и примерно соответствует содержанию хлорофилла, изменение количества или соотношения форм угольной кислоты, присутствующей в связанном состоянии в мембранах тилакоидов, может приводить к структурным изменениям мембранной системы хлоропласта.

Ранее высказывалось предположение, что КА тилакоидов и пул связанного бикарбоната участвуют в аккумуляции протонов и переносе их от протон-генерирующих помп к АТФ-синтазе (Онойко и др., 2010). Очевидно, что в связывании и переносе протонов могут участвовать лишь анионные формы угольной кислоты (HCO_3^- , CO_3^{2-}), скорость образования которых зависит от активности КА. Ингибирование КА, как показывают результаты настоящей работы, приводит к снижению содержания мембраносвязанного бикарбоната и структурным изменениям мембранной системы хлоропласта.

В дальнейшем предстоит выяснить, как наблюдаемые изменения в структуре тилакоидов могут влиять на эффективность трансформации световой энергии и сопряжение электронного и протонного транспорта в хлоропласте.

ЛИТЕРАТУРА

- Золотарева Е.К.* Участие связанного бикарбоната в фотосинтетическом протонном транспорте // *Фізіологія рослин: Проблеми та перспективи розвитку.* – К.: Логос, 2009. – Т. 1 – С. 91-112.
- Иванов Б.Н., Игнатова Л.К., Романова А.К.* Разнообразие форм и функций карбоангидразы высших наземных растений // *Физиология растений.* – 2007. – Т. 54, №2 – С. 165-185.
- Кабата-Пендиас А., Пендиас Х.* Микроэлементы в почвах и растениях. – М.: Мир, 1989. – 439 с.
- Никитин А.Т.* Экология, охрана природы, экологическая безопасность. – М.: Изд-во МИНЭПУ, 2000. – 648 с.
- Онойко Е.Б., Полищук А.В., Золотарева Е.К.* Стимулирование фотофосфорилирования в изолированных хлоропластах шпината экзогенным бикарбонатом: роль карбоангидразы // *Доповіди НАН України.* – 2010. – № 10. – С. 160-165.
- Подорванов В.В., Полищук А.В., Золотарева Е.К.* Влияние ионов меди на светоиндуцированный протонный перенос в хлоропластах шпината // *Биофизика.* – 2007. – Т. 52, № 6. – С. 1049-1053.
- Полищук А.В., Топчий Н.Н., Сытник К.М.* Влияние ионов тяжелых металлов на перенос электронов на акцепторной стороне фотосистемы II // *Доп. НАН України* – 2009. – № 6. – С. 204-211.
- Полищук О.В., Подорванов В.В., Сытник С.К.* Вплив іонів цинку на протонний перенос в ізольованих хлоропластах шпинату // *Доповіди НАН України.* – 2007. – № 8. – С. 174-178.
- Титов А.Ф., Таланова В.В., Казнина Н.М., Лайдинен Г.Ф.* Устойчивость растений к тяжелым металлам. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. – 172 с.
- Baranov S.V., Ananyev G.M., Klimov V.V., Dismukes G.C.* Bicarbonate accelerates assembly of the inorganic core of the water-oxidizing complex in manganese-depleted Photosystem II: A proposed biogeochemical role for atmospheric carbon dioxide in oxygenic photosynthesis // *Biochemistry.* – 2000. – V. 39, № 29. – P. 6060—6065.
- Bertrand M., Poirier I.* Photosynthetic organisms and excess of metals // *Photosynthetica* – 2005. –V. 43, № 3. – P. 345-353.
- Bjorkman O., Demmig-Adams B.* Regulation of photosynthesis light energy capture, conversion, and dissipation in leaves of higher plants. // *Ecophysiology of Photosynthesis.* – 1995. – P. 17-47.
- Burda K., Kruk J., Schmid G.H., Strzalka K.* Inhibition of oxygen evolution in photosystem II by Cu(II) ions is associated with oxidation of cytochrome *b559* // *Biochem. J.* – 2003. – V. 371. – P. 597-601.
- Ferro M., Salvis D., Brugièrè S., Miras S., Kowalski S., Louwagie M., Garin J, Joyard J., Rolland N.* Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana* // *Mol. Cell. Proteom.* – 2003. – V. 2. – P. 325-345.
- Gutknecht J., Bisson M.A., Tosteson F.C.* Diffusion of carbon dioxide through lipid bilayer membranes: effects of carbonic anhydrase, bicarbonate, and unstirred layers // *J. Gen. Physiol.* – 1977. – V. 69, № 6. – P. 779-794.
- Hall J.L.* Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance // *J. Exp. Bot.* – 2002. – V. 53. – P. 1-11.
- Jegerschöld C., Arellano J.B., Schroder W.P., van Kan P.J.M., Baron M., Styring S.* Copper(II) inhibition of electron transfer through photosystem II studied by EPR spectroscopy // *Biochemistry.* – 1995. – V. 34. – P. 12747-12754.
- Jegerschöld C., McMillan F., Lubitz W., Rutherford A.W.* Effect of copper and zinc ions on photosystem II. Studies by EPR spectroscopy // *Biochemistry.* – 1999. – V. 38. – P. 12439-12445.
- Lionetto M. G., Caricato R., Giordano M. E., Erroi E., Schettino T.* Carbonic anhydrase and heavy metals // *Biochemistry* / Ed. D. Ekinc. – 2012. – P. 205-224.
- Lu Y.-K., Theg S.M., Stemler A.J.* Carbonic anhydrase activity of the photosystem II OEC33 protein from pea plant // *Cell Physiol.* – 2005. – V. 46. – P. 1944-1953.
- Mohanti N., Vass I., Demeter S.* Copper toxicity affects photosystem II electron transport at the secondary quinone acceptor, QB // *Plant Physiol.* – 1989. – V. 90. – P. 175-179.
- Pedas P., Husted S.* Zinc transport mediated by barley ZIP proteins are induced by low pH // *Plant Signal. Behav.* – 2009. – V. 4, №9. – P. 842-845.
- Rudenko N. N., Ignatova L.K., Ivanov B. N.* Multiple sources of carbonic anhydrase activity in pea thylakoids: soluble and membrane-bound forms // *Photosynth. Res.* – 2007. – V. 91. – P. 81-89.
- Schreiber U., Bilger W., Neubauer C.* Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis // *Ecophysiology of Photosynthesis.* – 1995. – P. 49-69.

ДЕЙСТВИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

- Schröder W.P., Arellano J.B., Bittner T., Baron M.* Flash induced absorption spectroscopy studies of copper interaction with photosystem II in higher plants // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – P. 32865-32870.
- Singh D.P., Singh S.P.* Action of heavy metal on hill activity and O₂ evolution // *Plant Physiol.* – 1987. – V. 83. – P. 12-14.
- Stemler A.J.* The binding of bicarbonate ions to washed chloroplast grana // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1977. – V. 460, № 3. – P. 511-522.
- Stemler A.J.* The bicarbonate effect, oxygen evolution, and the shadow of Otto Warburg // *Photosynth. Res.* – 2002. – V. 73, № 1-3. – P. 177-183.
- Techau M.E., Valdez-Taubas J., Popoff J.F., Francis R., Seaman M., Blackwell J.M.* Evolution of differences in transport function in slc11a family members // *J. Biol. Chem.* – 2007. – V. 282. – P. 35646-35656.
- Tripathy B.C., Mohanty P.* Zinc-inhibited electron transport of photosynthesis in isolated barley chloroplasts // *Plant Physiol.* – 1980. – V. 66. – P. 1174-1178.
- Van Assche F., Clijsters H.* Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentration of Zinc: Effect on Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase // *J. Plant Physiol.* – 1986. – V. 125. – P. 355-360.
- Van Kooten O., Snel J. F. H.* The use of chlorophyll nomenclature in plant stress physiology // *Phot. Res.* – 1990. – V. 25, № 3. – P. 147-150.
- Techau M.E., Valdez-Taubas J., Popoff J.F., Francis R., Seaman M., Blackwell J.M.* Evolution of differences

Поступила в редакцию
25.06.2013 г.

EFFECTS OF HEAVY METALS ON PHOTOSYNTHETIC APPARATUS AND CARBONIC ANHYDRASE ACTIVITY IN PEA CHLOROPLASTS

M. V. Vodka, O. V. Polishchuk, N. O. Bilyavs'ka, E. K. Zolotareva

*M.G. Kholodny Institute of Botany
of National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)*

The effects of heavy metals (Cu²⁺ and Zn²⁺) on the structure and functional characteristics of photosynthetic apparatus in pea chloroplasts were investigated. After treatment of pea leaves with 80 μM Cu²⁺ or 200 μM Zn²⁺, significant structural alterations in the chloroplasts were observed, such as heterogeneity of thylakoid packaging in grana, changes in the structure of grana, revealed as increased thickness of granal thylakoids and interspace between thylakoids in comparison with the control. At the same time, maximum quantum yield, photochemical quenching of chlorophyll fluorescence (F_v/F_m, qP), and electron transport rate from water to methyl viologen remained unaffected, except for qP decrease by 20% in the presence of 200 μM Zn²⁺. The content of weekly bound bicarbonate was lowered by 16 % and 20 % in the presence of copper and zinc ions, respectively. The partial loss of bound bicarbonate might be associated with inhibition of carbonic anhydrase activity that was decreased by 70% in the presence of 80 μM Cu²⁺ or 200 μM Zn²⁺. Based on the data, we suppose that structural alterations are caused by lowering of bicarbonate content in thylakoid membrane in the presence of Cu²⁺ and Zn²⁺.

Key words: *Pisum sativum L., bicarbonate, carbonic anhydrase, chloroplast, grain, heavy metals, inhibitors, photosynthetic apparatus, thylakoid*

**ВПЛИВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА ФОТОСИНТЕТИЧНИЙ
АПАРАТ ТА КАРБОНГІДРАЗНУ АКТИВНІСТЬ
ХЛОРОПЛАСТІВ ГОРОХУ**

М. В. Водка, О. В. Поліщук, Н. О. Білявська, О. К. Золотарьова

*Інститут ботаніки ім. М.Г.Холодного
Національної академії наук України
(Київ, Україна)*

Досліджували вплив важких металів (іонів Cu^{2+} і Zn^{2+}) на структуру та функціональні показники фотосинтетичного апарату листків гороху. Після обробки листків гороху 80 мкМ Cu^{2+} і 200 мкМ Zn^{2+} спостерігалася зміна будови гран, неоднорідність упаковки тилакоїдів у гранах, що вивлялося у збільшенні міжтилакоїдних проміжків і товщини тилакоїдів гран порівняно з контролем. Разом з тим, швидкість транспортування електронів від води до метилвіологену, максимальний квантовий вихід і фотохімічне гасіння флуоресценції хлорофілу (F_v/F_m , qP) в листках та хлоропластах гороху, оброблених 80 мкМ Cu^{2+} , лише незначно змінювалися. Подібні ефекти зареєстровано також після обробки лисків і хлоропластів 200 мкМ Zn^{2+} , за тим винятком, що параметр qP в цьому випадку знижувався порівняно з контролем на 20%. Отримані дані дозволяють припустити, що структурні зміни в системі тилакоїдних мембран спричинені зниженням рівня зв'язаного бікарбонату на 16 і 20% в присутності іонів міді та цинку, відповідно. За умов експериментів 80 мкМ Cu^{2+} і 200 мкМ Zn^{2+} пригнічували активність хлоропластної карбоангідрази на 70%, що, можливо, й призводило до часткової втрати мембранозв'язаного бікарбонату.

Ключові слова: *Pisum sativum L.*, бікарбонат, важкі метали, грана, інгібітори, карбоангідраза, хлоропласт, тилакоїд, фотосинтетичний апарат