

Uticaj promena u tilakoidnim membranama na otpornost i adaptivnost prema temperaturi i suši samooplodnih linija kukuruza (*Zea mays L.*)

- Originalan naučni rad -

Čedomir RADENOVIĆ¹, Ilija SATARIĆ¹, Milosav BABIĆ¹, Nenad DELIĆ¹, Mile IVANOVIĆ² i Lazar KOJIĆ¹

¹Institut za kukuruz "Zemun Polje", Beograd-Zemun

²Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

Izvod: Utvrđene su termalne karakteristike fotosintetičnog aparata proučavanih samooplodnih linija kukuruza, i to: određena je temperaturna zavisnost u opsegu od 25 do 60 °C, otkrivene su kritične temperature na kojima dolazi do faznih transformacija u tilakoidnoj membrani, obračunate su energije aktivacije (Ea, kJ/mol) duž pravih linija pre i posle kritične temperature. Ea je mera nastajanja rekombinacionih reakcija povezanih sa uspostavljanjem zaksnele fluorescencije (ZF) hlorofila, a time i ukupnih promena u strukturi i funkciji tilakoidnih membrana.

Rezultati i diskusija izloženih parametara ukupnih terminalnih procesa ZF hlorofila, kao što su: temperaturna zavisnost, kritične temperature i energija aktivacije, mogu doprineti egzaktnijem karakterisanju samooplodnih linija kukuruza u odnosu na njihovu otpornost i adaptivnost prema temperaturi i suši. Sve ovo doprinosi egzaktnijem, bržem i racionalnijem odvijanju procesa selekcije.

Ključne reči: Fotosintetički proces, samooplodna linija kukuruza, tilakoidna membrana, zaksnela fluorescencija.

Uvod

Iako su fotosintetički procesi veoma rašireni, visoko produktivni po intenzitetu, vrlo kompleksni po svojoj prirodi i mnogo izučavani, oni nisu našli značajnu aplikaciju u oplemenjivanju biljaka. Takvo stanje je verovatno posledica postojanja više funkcionalnih međuzavisnosti koje objedinjuju strukturnodinamične promene unutar hloroplasta i njihovih tilakoidnih membrana, sa jedne, i delovanja

više faktora spoljašnje sredine na njih, sa druge strane.

Zakasnela fluorescencija (ZF) hlorofila se fenomenološki može opisati kao pojava svetljenja (bioluminescencija) biljnih sistema: bakterija, algi i viših biljaka u crvenoj oblasti spektra, neposredno nakon intermitentnog osvetljavanja lista, **Radenović**, 1992, 1994, 1997. ZF hlorofila su otkrili **Strehler i Arnold**, 1951, pokušavajući da razjasne prirodu indukovane produkcije u vidu bioluminescencije. Brojna proučavanja, pogotovo poslednjih dvadeset godina (1980-2000. godine), **Jursinic**, 1986, **Marković i sar.**, 1993, 1996, **Veselovski i Veselova**, 1990, otkrila su direktnu povezanost ZF hlorofila sa fotosintetičkim procesima, u kojima se ZF hlorofila smatra njihovim nezaobilaznim indikatorom - osetljivom "sondom" za eksperimentalna fotosintetička proučavanja, **Radenović i sar.**, 1994a, 1994b, **Radenović i Jeremić**, 1996, **Marković i sar.**, 1987, 1996, 1993, 1999. Već danas, a pogotovo u skoroj budućnosti, ZF hlorofila će služiti kao efikasno sredstvo, odnosno kao savremeni metodski postupak pri proučavanju određenih, iako složenih fotoprocesa u "svetloj" fazi fotosinteze. Kao aktuelna pitanja u vezi sa ovim smatraju se termalni procesi ZF hlorofila, kritične temperature u tilakoidnim membranama i promena energije aktivacije u njima, **Radenović**, 1997, **Radenović i Jeremić**, 1996.

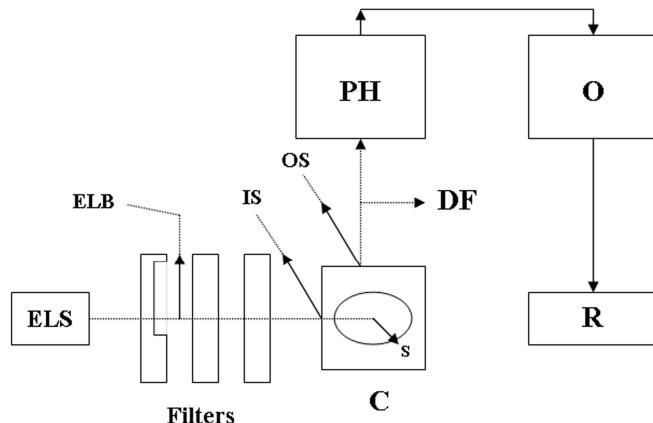
Poslednjih godina (1980-2000) činjeni su pokušaji u Institutu za kukuruz "Zemun Polje", da se složeni fotosintetički procesi stave u funkciju egzaktnijeg pristupa pri karakterizaciji samooplodnih linija kukuruza, što može biti od koristi za egzaktniju racionalizaciju procesa oplemenjivanja. Radi toga, u Institutu je razrađen novi neinvazivni metod za merenje ZF hlorofila na intaktnim listovima samooplodnih linija kukuruza, **Radenović**, 1979, 1992, 1997, **Vučinić i sar.**, 1982, **Marković i sar.**, 1987, 1993, 1999.

Cilj ovoga rada bio je da se utvrdi uticaj viših i visokih temperatura, kao i suše, na promenu ukupnih termalnih procesa ZF hlorofila u tilakoidnim membranama proučavanih samooplodnih linija kukuruza. Dobijene promene u intenzitetu ZF hlorofila, promene u aktivacionim energijama i određivanje vremena pojavljivanja kritičnih temperatura na kojima dolazi do evidentnih strukturalnih promena u tilakoidnim membranama, dobar su pokazatelj za ocenu otpornosti i adaptivnosti ispitivanih samooplodnih linija kukuruza prema višim i visokim temperaturama, kao i prema suši.

Materijal i metode

Kao materijal - objekat ispitivanja u ovim istraživanjima korišćene su dve samooplodne linije kukuruza ZP PL 53 i ZP PL 14, kreacije Instituta za kukuruz "Zemun Polje".

Neinvazivni metod za merenje ZF hlorofila shematski je prikazan na Slici 1. Navedena blok shema bioluminiscentne metode razvijena je i najduže se koristi u Institutu za kukuruz "Zemun Polje". Merenje promene intenziteta ZF hlorofila vršeno je po metodu koji je, u principu i pojedinostima, opisan u radovima, **Radenović**, 1979, 1992, 1994, 1997, **Marković i sar.**, 1996.



Slika 1. Principijelna šema metoda i aparature za merenje zakisnele fluorescencije hlorofila: C - mračna komora sa postoljem za uzorke, S - uzorak (segment lista), filetri, ESI - izvor ekscipirajuće svetlosti, PH - fotomultiplikator, O - osciloskop, R - pisač, ELB - eksipirajući zrak, ZF - luminiscentna svetlost, IS - ulazni prorez, OS - izlazni rez iz komore.

Potential scheme of the method and the equipment for measuring chlorophyll delayed fluorescence: C - dark chamber with a sample stand; s - sample (leaf segment), filters, ELS - excitation light source, PH - photo-multiplier; O - oscilloscope, R - printer, ELB - excitation light beam, DF - luminescent light, IS - input chamber slot, OS - output chamber slot

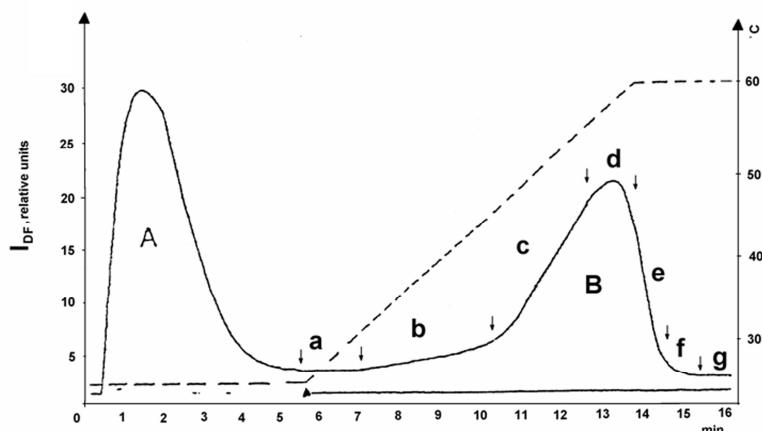
Ispitivani objekti su gajeni u oglednom polju. Tokom jula i avgusta biljke kukuruza su ujutru (između 7⁰⁰ i 8⁰⁰ časova) donošene iz polja u laboratoriju. Prilikom uzimanja iz polja biljke su koso zasecene na prizemnoj internodiji. U laboratoriji su biljke držane tako što su bile postavljene u vodu po dužini jedne internodije. Dva časa pre bioluminiscentnog eksperimenta biljke su držane u staklenom zvonu. Sa takvih biljaka je uziman segment intaktnog lista na klipu i stavljan u komoru fosforoskopa (Slika 1). U ovim eksperimentima, segmenat lista je držan u komori (u mraku) najmanje 15 minuta. Prilikom praćenja uticaja suše, biljke (posebno njihovi listovi), držani su na vazduhu 24 časa. Ovakva merenja izvršena su na 288 biljaka.

Rezultati i diskusija

U okviru ukupnih uslova merenja ZF hlorofila dobijeni su karakteristični rezultati o promeni intenziteta u vidu indukcione i termalne krive (Slika 2). U ovom radu posebno je razmatran uticaj temperature na stacionarni nivo ZF hlorofila. Taj uticaj temperature (koja je kontinualno povećavana u opsegu 24-60°C) na intenzitet i kinetiku termalnih procesa ZF hlorofila analiziran je praćenjem promena kod posmatranih segmenata termalne krive na Slici 2.

Pri proučavanju linija kukuruza bilo je potrebno razlikovati navedene segmente termalne krive i registrovati značajne razlike u dužini trajanja, i to:

- a – stacionarni nivo intenziteta ZF traje 72 ± 6 sekundi,
 b – početno povećavanje intenziteta ZF traje 984 ± 8 sekundi,
 c – strmo, linearalno povećavanje intenziteta ZF traje 408 ± 5 sekundi,
 d – maksimalni nivo intenziteta ZF traje 210 ± 4 sekundi,
 e – nagli, linearni pad intenziteta ZF traje 194 ± 7 sekundi,
 f – ustupreno smanjenje intenziteta ZF traje 138 ± 5 sekundi, i
 g – iscrpljeni nivo intenziteta ZF traje 84 ± 3 sekundi.



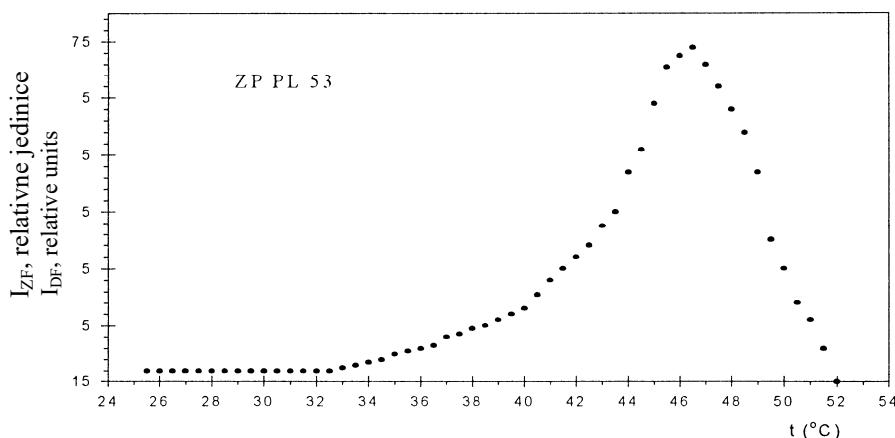
Slika 2. Shematski prikaz tipičnih promena intenziteta ZF hlorofila na intaktnom listu proučavanih samooplodnih linija kukuruza (puna linija) i promene temperature (isprekidana linija): kriva A označava indukcione procese ZF hlorofila, a kriva B obuhvata termalne procese ZF hlorofila.

Schematic presentation of characteristic changes of chlorophyll DF intensities in intact leaves of observed maize inbred lines (solid line) and temperature changes (dashed line): curve A stands for induction processes of chlorophyll DF, while curve B stands for thermal process of the chlorophyll DF

Unutar navedenih segmenata termalne krive, a naročito na njihovim granicama, dolazi do navedenog temperaturnog uticaja (Slika 2). Direktnim vršenjem eksperimenata dobijaju se rezultati o promeni intenziteta ZF hlorofila u funkciji vremena nastajanja. Ovako dobijeni rezultati poslužili su za računsku i statističku obradu i kao takvi izlažu se u ovom radu za svaku samooplodnu liniju kukuruza posebno.

Na Slici 3 data je temperaturna zavisnost linije ZP PL 53 u opsegu temperature od 24°C do 60°C . Intenzitet ZF hlorofila u njegovom rastućem trendu (Slika 2 b-d), počinje da se povećava već na $33,0^{\circ}\text{C}$. Rastenje intenziteta ZF hlorofila se nastavlja sa njegovom promenom na 40°C , a zatim na $43,5^{\circ}\text{C}$ i dalje, do njegovog zaobljenog maksimuma na 45°C i 47°C . Opadanje intenziteta ZF hlorofila sa daljim povećavanjem temperature je monotonije, strmije i linearnije (Slika 3).

Arenijusovim kriterijumom o linearizaciji temperaturne zavisnosti ZF hlorofila



Slika 3. Promena intenziteta zakasnele fluorescencije hlorofila (I_{ZF}) termalnih procesa u zavisnosti od delovanja temperature u tilakoidnoj membrani intaktnog lista samooplodne linije ZP PL 53.

Changes of chlorophyll delayed fluorescence intensities (I_{DF}) of thermal processes in dependence on temperature impacts in thylakoid membranes of the intact leaf of the maize inbred line ZP PL 53.

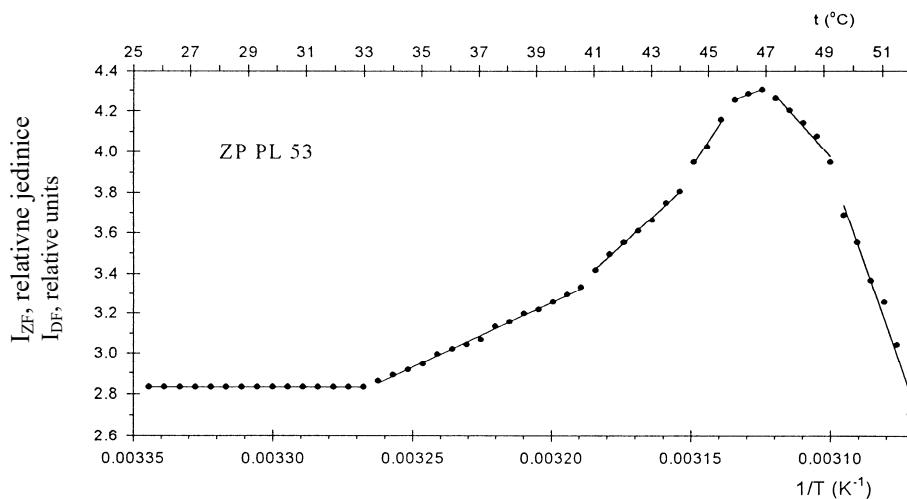
promena u tilakoidnoj membrani samooplodne linije ZP PL 53 (Slika 4, Tabela 1). Vrednost kritičnih temperatura u °C, njihov broj i međusobna udaljenost, karakterišu samooplodne linije kukuruza u odnosu na njihovu otpornost prema višim i visokim temperaturama, kao i prema suši.

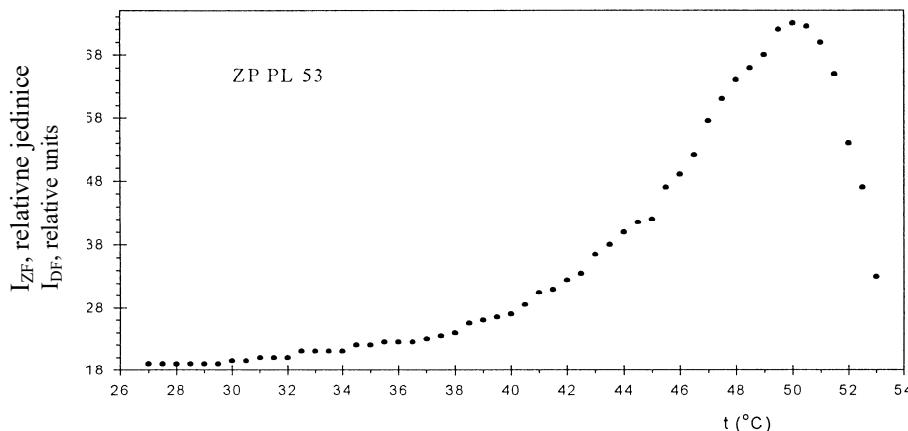
Arenijusov kriterijum zasnovan je na postojanju pravih linija. Svaka Arenijusova prava linija reprezentuje svoju energiju aktivacije (Ea). Mesto gde se dve prave linije presecaju određeno je kritičnom temperaturom. Svakoj od navedenih kritičnih temperatura jedna vrednost Ea prethodi, a druga vrednost Ea sledi (Slika

Tabela 1. Promena energije aktivacije (Ea) i kritičnih temperatura za vreme termalnih procesa u tilakoidnoj membrani intaktnog lista samooplodne linije kukuruza ZP PL 53, ZP PL 14 i ZP PL 53 - list držan na vazduhu 24^h.

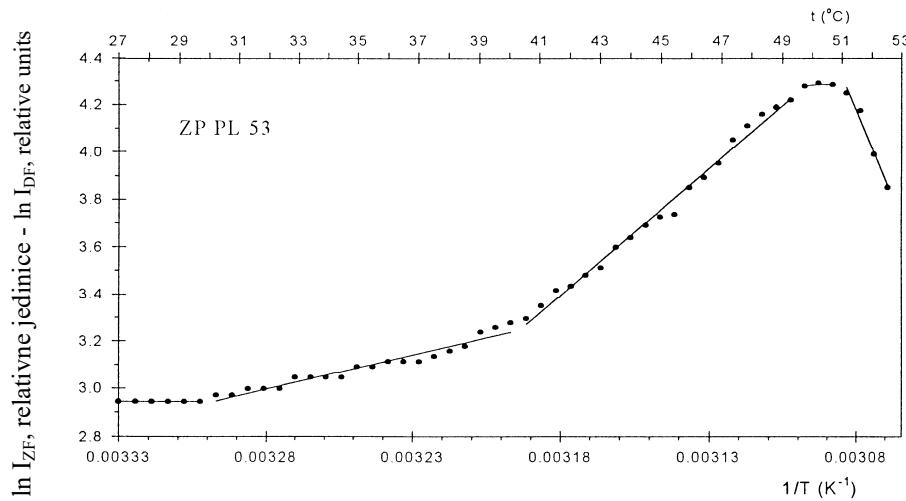
Changes of Activation Energy (Ea) and Critical Temperatures during Thermal Processes in Thylakoid Membranes of the Intact Leaf of the Maize Inbred Lines ZP PL 53, ZP PL 14 and Maize Inbred Line ZP PL 53 - Air Drought Treatment for 24 hours.

ZP PL 53		ZP PL 14		ZP PL 53 list držan na vazduhu 24 h ZPPL 53 - air drought treatment for 24 hr	
Ea, kJ/mol	t, °C	Ea, kJ/mol	t, °C	Ea, kJ/mol	t, °C
-	33,5	-	27,0	-	30,0
-54,5	40,0	-62,9	29,5	-24,1	40,5
-105,0	44,0	-26,1	35,0	-24,1	49,5
-174,0	46,0	-61,5	47,5	-6,0	51,0
-41,0	47,0	24,2	49,5	242,3	-
128,5	49,5	227,2	53,0	-	-
326,0	-	124,2	-	-	-





Slika 5. Promena intenziteta zakasnele fluorescencije hlorofila (I_{ZF}) termalnih procesa u zavisnosti od delovanja temperature u tilakoidnoj membrani intaktnog lista samooplodne linije kukuruza ZP PL 53 koja je tretirana vazdušnom sušom.
Changes of chlorophyll delayed fluorescence intensities (I_{DF}) of thermal processes in dependence on temperature impacts in thylakoid membranes of the intact leaf of the maize inbred line ZP PL 53 treated by air drought.



Slika 6. Arenijusov kriterijum za određivanje kritičnih temperatura (presek dveju pravih linija) koje uslovjavaju strukturne promene u tilakoidnoj membrani intaktnog lista samooplodne linije kukuruza ZP PL 53 koja je tretirana vazdušnom sušom.
Arrhenius plot for the evaluation of critical temperatures (an interception point of straight lines) that cause conformational changes in thylakoid membranes of the intact leaf of the maize inbred line ZP PL 53 treated by air drought.

četvrti tipično mesto odnosi se na linearnu monotonost i dinamiku opadajućeg delaintenziteta ZF hlorofila. Navedena, iako karakteristična mesta po uticaju temperature, samo su nagoveštaji mogućih strukturalnih promena u tilakoidnoj membrani proučavanih samooplodnih linija kukuruza i ona su samo delimično u literaturi sadržana, *Vučinić i sar.*, 1982, *Radenović*, 1994, *Marković i sar.*, 1987.

Arenijusovim kriterijumom i linearizacijom temperaturne zavisnosti ZF hlorofila utvrđene su kritične temperature na kojima dolazi i do najmanjih strukturalnih promena u tilakoidnoj membrani proučavanih samooplodnih linija kukuruza. Vrednosti kritičnih temperatura u °C, njihov broj i međusobna udaljenost karakterišu samooplodnu liniju kukuruza u odnosu na njenu otpornost i adaptivnost prema višim i visokim temperaturama, kao i prema suši.

Arenijusov kriterijum zasnovan je na postojanju pravih linija. Svaka Arenijusova prava linija reprezentuje energiju aktivacije (Ea). Mesto gde se dve prave presecaju određeno je kritičnom temperaturom. Svakoj od kritičnih temperatura prvo prethodi jedna vrednost Ea, a zatim sledi još jedna vrednost Ea, *Radenović*, 1985, 1997, *Marković i sar.*, 1993, 1996. Termalni procesi ZF hlorofila, kod svih proučavanih samooplodnih linija kukuruza, imaju negativne energije aktivacije i to samo u delu termalne krive sa rastućim intenzitetom ZF hlorofila (Slika 2 a-d). Međutim, u delu termalne krive sa opadajućim intenzitetom ZF hlorofila energije aktivacije su pozitivne. Ovakve negativne energije aktivacije u termalnim procesima tilakoidne membrane samooplodnih linija kukuruza, prvi put se konstatuju u ovom radu. Pojava negativnih energija aktivacije, u rastućem delu termalne krive, objašnjava se time da sa porastom temperature dolazi do takvih, nekada manjih, nekada većih, strukturalnih promena kod molekula u tilakoidnoj membrani, usled kojih ti molekuli postaju reaktivniji, a time oni stiču novu energiju koju koriste u rekombinacionom procesu nastajanja ZF hlorofila.

U opadajućem delu termalne krive Ea je pozitivna, što se objašnjava identičnim načinom kakav je u svim hemijskim reakcijama. Naime, tilakoidne membrane su pretrpele značajne strukturne promene, posebno u delu termalne krive, posle nastanka maksimalne vrednosti intenziteta i njegovog naglog linearног pada. Ovakvo stanje u tilakoidnoj membrani mnogo više odgovara neživotu, nego životu stanju organizma, kako po svojoj strukturi, tako i po svojim funkcijama. Prisustvo pozitivne energije aktivacije u ovakovom fotosintetičnom procesu potiče od sunčeve energije.

Sa žaljenjem možemo konstatovati da nema literature o ZF hlorofila intaktnih listova viših biljaka, koja bi sadržala rezultate sa pokazateljima za karakterisanje samooplodnih linija kukuruza u odnosu na njihovu otpornost i adaptivnost prema višim i visokim temperaturama, kao i prema suši. Literatura koja postoji, koja je inače korišćena pri pisanju ovog rada, više se odnosi na procese i mehanizme nastajanja i odvijanja ZF hlorofila od interesa za biofizička, biohemijska i fiziološka istraživanja ukupnog fotosintetičkog procesa, *Jursinic*, 1986, *Kerečki sar.*, 1986, *Marković i sar.*, 1987, 1993, 1999, *Radenović*, 1992, 1994, 1997.

U ovom radu učinjen je napor da se iskoriste stečena znanja i višegodišnje iskustvo i da se utvrde parametri koji se primenjuju u procesima egzaktnijeg i

racionalnijeg oplemenjivanja kukuruza. Bioluminiscentni metod o ZF hlorofila je, sa naše strane, u potpunosti završen, a budući da je neinvazivan, on je još više, ne samo originalan, nego i perspektivan u oblasti oplemenjivanja biljaka.

Zaključak

Na osnovu iznetih rezultata istraživanja i njihove diskusije može se konstatovati da se ovaj metod o zakasneloj fluorescenciji hlorofila, kao neinvazivni bioluminiscentni metod, kandiduje za primenu u oplemenjivanju i semenarstvu radi utvrđivanja ocene samooplodnih linija kukuruza na otpornost i adaptiranost prema višim i visokim temperaturama, kao i prema suši.

Utvrđene su sledeće termalne karakteristike fotosintetičkog aparata proučavanih samooplodnih linija kukuruza:

- temperaturna zavisnost u opsegu 25°C - 60°C,
- vrednost za kritične temperature na kojima dolazi do manjih i većih strukturnih promena u tilakoidnim membranama,
- vrednosti za energije aktivacije (E_a , kJ/mol) duž pravih linija pre i posle pojave kritične temperature u termalnom procesu.

Utvrđena je različita monotonost u rastućem delu intenziteta termalne krive, što ukazuje na nejednaku otpornost i adaptiranost ispitivanih samooplodnih linija kukuruza prema višim i visokim temperaturama, kao i prema suši.

Literatura

- Jursinic, P.** (1986): Delayed Fluorescence: Current Concepts and Status. In: Light Emission by Plants and Bacteria, ed. Govindjee, Amesz&Fork CD, Academic Press, Orlando, FL, USA, pp. 291-328.
- Kerečki, B., Lj. Zarić, M. Penčić i Č. Radenović** (1986): Neki pokazatelji otpornosti prema nepovoljnim temperaturama i njihova primena u selekciji kukuruza. U: Genetika i oplemenjivanje kukuruza, Beograd, Jugoslavija, str. 293-308.
- Marković, D., M. Jeremić i Č. Radenović** (1996): Zakasnela fluorescencija hlorofila. U: Savremena Biofizika, izd.Velarta, Beograd, Jugoslavija, str. 1-102.
- Marković, D., M. Jeremić, Č. Radenović and M. Schara** (1993): Irreversible structural changes in thylakoid membranes at high temperatures detection by luminescence and EPR. Gen. Physiol. Biophys. 12: 37-47.
- Marković, D., M. Jeremić, Č. Radenović and Ž. Vučinić** (1987): A study of temperature induced structural changes in photosynthetic system using delayed fluorescence. Jurnal Serb. Chem. Soc. 52: 331-336.
- Marković, D., Č. Radenović, L. Rafailović, S. Žerajić, M. Jeremić and M. Marković** (1999): Temperature dependence of delayed fluorescence induction curve transients. Gen. Physiol. Biophys. 18: 257-267.

- Radenović, Č.** (1979): Neinvazivni bioluminescentni metod u principu i pojedinostima. Interna publikacija Instituta za kukuruz "Zemun Polje", Beograd, str. 1-23.
- Radenović, Č.** (1985): Boltzmanov izraz za aktivacionu energiju i njegova primena u biološkim sistemima. Interna publikacija Instituta za kukuruz "Zemun Polje", Beograd, str. 1-9.
- Radenović, Č.** (1992): Proučavanje fotoindukovane bioluminescencije kod lista kukuruza. Savrem. poljopr. **40** (6): 15-38.
- Radenović, Č.** (1994): A study of delayed fluorescence in plant models: Photosynthetic transportation and membrane processes. Journal Serb. Chem. Soc. 59: 595-617.
- Radenović, Č.** (1997): Induction processes and activation energy of delayed chlorophyll fluorescence. Proceedings of Natural Sciences of Matica Srpska 93: 5-14.
- Radenović, Č., M. Babić, N. Delić, I. Šatarić i L. Kojić** (2002): Новый фотосинтетическо-биолуминисцентный метод в селекции кукурузы. Кукуруза и сорго 4: 21-24.
- Radenović, Č. and M. Jeremić** (1996): The study of delayed light emission in plant models. Arch. Biol. Sci. 48: 1-18.
- Radenović, Č., M. Jeremić i D. Marković** (1994a): Фотоиндуцированая биоломинисценция растений фотосинтетические, транспортные и мембранные процессы. Физиология и биохимия культурных растений 26: 419-433.
- Radenović, Č., M. Jeremić and D. Marković** (1994b): Delayed chlorophyll fluorescence in plant models. Photosynthetica 30: 1-24.
- Strehler, L.B. and W. Arnold** (1951): Light production by green plants. J. Gen. Physiol. 34: 809-820.
- Veselovski, V.A. and T.V. Veselova** (1990): Luminescent Characteristics of Plants Photosynthetic Apparatus. In: Luminescence of Plants, ed. Nauka, Moscow, Russia, pp. 8-78.
- Vučinić, Ž., B. Nešić and Č. Radenović** (1982): Delayed fluorescence as an *in situ* probe of fluidity changes in maize photosynthetic apparatus. Period. biol. 84: 223-226.

Primljeno: 11.05.2007.

Odobreno: 23.05.2007.

* * *

Effects of Changes in Thylakoid Membranes on Resistance and Adaptability of Maize (*Zea mays L.*) Inbred Lines to Temperatures and Drought

- Original scientific paper -

Čedomir RADENOVIĆ¹, Ilija ŠATARIĆ¹, Milosav BABIĆ¹, Nenad DELIĆ¹, Mile IVANOVIĆ² and Lazar KOJIĆ¹

¹Maize Research Institute, Zemun Polje, Belgrade-Zemun

²Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad

S u m m a r y

The delayed chlorophyll fluorescence method, as a non-invasive bioluminescence method, is recommended for the application in maize breeding and seed production in order to evaluate maize inbred lines for their resistance and adaptability to increased and high temperatures, as well as, to drought.

The flowing thermal properties of the photosynthetic apparatus of the observed maize inbred lines: the temperature dependence within a range of 25-60°C, critical temperatures at which phase transitions occur in the thylakoid membrane were discovered and by means of its significant functional changes in the photosynthetic apparatus of observed maize inbred lines were detected. Activation energies (Ea, kJ mol⁻¹) alongside the straight lines prior and after critical temperatures were calculated. Ea are a measure of occurrence of chlorophyll DF recombination processes and by that a measure of the total changes in structure and functioning of the thylakoid membranes.

Thylakoid membranes underwent significant conformational changes in the part following the maximum intensity, i.e. in the part of its sharp linear decline. Such a state fits more to a nonliving than a living organism in relation to its both, structure and functions.

Results and the discussion of presented parameters of total thermal processes of chlorophyll DF, such as: temperature dependence, critical temperatures and activation energy, can be an important factor for a more exact characterisation of maize inbred lines in relation to their resistance and adaptation to temperature and drought, contributing to a rapider and more rational development of the selection process.

Received: 11/05/2007

Accepted: 23/05/2007

Adresa autora:

Čedomir RADENOVIĆ

Institut za kukuruz "Zemun Polje"

Slobodana Bajića 1

11000 Beograd

Srbija

E-mail: radenovic@beotel.yu