

Mehanizmi i parametri tranzijenata i oscilacija indukcionih procesa zakasnele fluorescencije hlorofila u pobuđenoj tilakoidnoj membrani intaktnog lista kukuruza*

- Originalan naučni rad -

Čedomir RADENOVIC^{1,2*}, Milorad JEREMIC², Georgij MAKSIMOV³,
Miloš BELJANSKI⁴, Milomir FILIPOVIC¹ i Zoran ČAMDŽIJA¹

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

² Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu, Beograd

³ Biološki fakultet, Moskovski državni univerzitet "M. V. Lomonosov", Moskva

⁴ Institut za opštu i fizičku hemiju, Beograd

Izvod: Razloženi indukciono procesi zakasnele fluorescencije (ZF) hlorofila na tranzijente: A, B, C, D i E nastaju kada se segment intaktnog lista linija i hibrida kukuruza drži u mračnoj komori fosforskopa znatno kraće vreme ($30 \text{ s} \leq \tau \leq 240 \text{ s}$), pre njegovog intermitentnog osvetljavanja sa belom svetlošću. Tranzijente indukcionih procesa: A, B, C, D i E karakterišu njihovi vremenski parametri: t_A , t_B , t_C , t_D i t_E , promena intenziteta tranzijenata, parametri i mehanizmi njihovog nastajanja. Razloženi indukciono procesi ZF hlorofila intaktnog lista linija i hibrida kukuruza na tranzijente: A, B, C, D i E praćeni su pojavom i različitim nivoima vrednosti energije aktivacije (E_a , kJ/mol) koje odgovaraju različitim kritičnim temperaturama faznih prelaza u pobuđenoj tilakoidnoj membrani. Mehanizmi nastajanja tranzijenata indukcionih procesa: A, B, C, D i E imaju dve prirode. Tranzijenti A i B su fizičke, a tranzijenti: C, D i E su hemijske prirode. Pokazano je da nastajanje tranzijenata: B, C, D i E istovremeno prati uspostavljanje oscilacija indukcionih procesa ZF hlorofila. Po našoj hipotezi, međuzavisnost tranzijenata i oscilacija indukcionih procesa ZF hlorofila dovode se u neraskidivu vezu. Oscilovanje indukcionih procesa ZF hlorofila objašnjava se strukturnim i funkcionalnim promenama u pobuđenoj tilakoidnoj membrani intaktnog lista linija i hibrida kukuruza koji su gajeni u uslovima vazdušne suše, povećanih temperatura i deficita vode u podlozi.

Ključne reči: Indukciono procesi, intaktni list, oscilacije, tilakoidna membrana, tranzijenti, zakasnela fluorescencija hlorofila, *Zea mays* L.

*Ovaj rad autori posvećuju uspomeni i dugom sećanju na lik i delo prerano preminulom Profesoru Dušanu Večeliću, utemeljivaču molekularne biofizike u Srbiji

Uvod

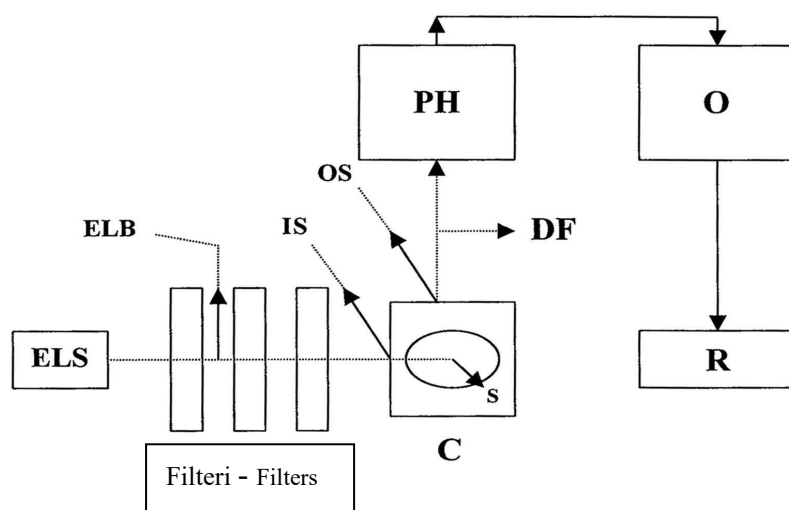
Zakasnela fluorescencija (ZF) hlorofila se fenomenološki može opisati kao pojava svetljenja (bioluminescencija) živih sistema: bakterija, algi i viših biljaka (kukuruz) u crvenoj oblasti spektra, neposredno nakon intermitentnog osvetljavanja (pobuđivanja) intaktnog lista, **Radenović**, 1994, **Jurisnic** i **Govindjee**, 1982, **Radenović i sar.**, 1994a, 1994b, ZF hlorofila su otkrili Strehler i Arnold, 1951, pokušavajući da razjasne prirodu indukovano svetljenja u vidu bioluminescencije. Brojna proučavanja, pogotovu poslednjih dvadeset i pet godina, **Radenović**, 1997, **Jurisnic**, 1986, **Veselovski i Veselova**, 1990, **Radenović i sar.**, 1994a, 1994b, **Marković i sar.**, 1987, 1999, 2001, **Radenović i Jeremić**, 1996, otkrila su direktnu povezanost ZF hlorofila sa fotosintetičnim procesima u kojima se ZF hlorofila smatra njihovim nezaobilaznim indikatorom - osetljivom "sondom" za eksperimentalna fotosintetična proučavanja kod intaktnog lista linija i hibrida kukuruza, **Radenović**, 1994, **Jurisnic** i **Govindjee**, 1982, **Jurisnic**, 1986, **Veselovski i Veselova**, 1990, **Marković i sar.**, 1987, 1999, 2001. Već danas, ZF hlorofila služi kao efikasno sredstvo, odnosno kao savremeni metodski postupak pri proučavanju određenih, često vrlo složenih fotoprocasa u "svetloj" fazi fotosinteze. U vezi sa ovim, kao vrlo aktuelna naučna pitanja, smatraju se indukcioni procesi ZF hlorofila, njihovo razlaganje na više međusobno zavisnih tranzijenata, nastajanje oscilacija i ritmova i njihova međuzavisnost, **Radenović**, 1997, **Radenović i sar.**, 1981. Isto tako, nameće se pitanje o energiji aktivacije i kritičnim temperaturama faznih prelaza pobuđene tilakoidne membrane unutar dešavanja ukupnih indukcijskih procesa ZF hlorofila, **Radenović i sar.**, 2007b. Cilj ispitivanja je kako nastaje i kolika je međuzavisnost tranzijenata i oscilacija unutar indukcijskih procesa ZF hlorofila.

Materijal i metode

Ispitivanja su vršena na intaktnom listu četiri hibrida kukuruza (*Zea mays* L.): ZP 360, ZP 46A, Zp 633 i ZP 704, kao i na dve samooplodne linije: ZPR 70ž i Oh 43, tolerantnih i otpornih na delovanje viših i visokih temperatura, kao i suše. Za ova proučavanja biljke su gajene u staklari u sudovima sa zemljom u uslovima kontrolisane vazdušne suše i umanjene količine vode u podlozi **Radenović i sar.**, 2001. Promena temperature je kontrolisana u opsegu od 28 do 38°C. U takvim uslovima biljke su gajene u svim fazama njihovog rasteanja i razvika. Merenja su vršena četiri godine tokom juna, jula i avgusta meseca. Biljke kukuruza su donošene u laboratoriju iz staklare ujutro, između 7 i 8 časova. One su koso zasecane na prizemnoj internodiji. U laboratoriji su biljke držane tako što su bile postavljane u vodu po dužini jedne internodije. Dva časa pre fluorescentnog eksperimenta proučavane biljke su držane u staklenom zvonu crne boje. Sa takvih biljaka uziman je segment intaktnog lista na klip i stavljan u komoru modifikovanog Becquerelovog fosforoskopa. Ova ispitivanja vršena su na 40 biljka za svaki hibrid i liniju kukuruza.

Pri proučavanju korišćen je neinvazivni fotosintetično-fluorescentni metod za merenje intenziteta indukcionih procesa ZF hlorofila, što uključuje i razlaganje na tranzijente: A, B, C, D i E i registrovanje pojava oscilacija.

Neinvazivni fotosintetično-fluorescentni metod za merenje indukcionih procesa ZF hlorofila shematski je prikazan na Slici 1. Fotosintetično-fluorescentni metod razvijen je i više puta poboljšavan u Institutu za kukuruz "Zemun Polje". Merenje promene intenziteta indukcionih procesa ZF hlorofila vršeno je po metodu koji je, u principu i pojedinostima, opisan u radovima **Radenović**, 1997, **Radenović i sar.**, 1981, **Radenović i sar.**, 2007a, 2007b.

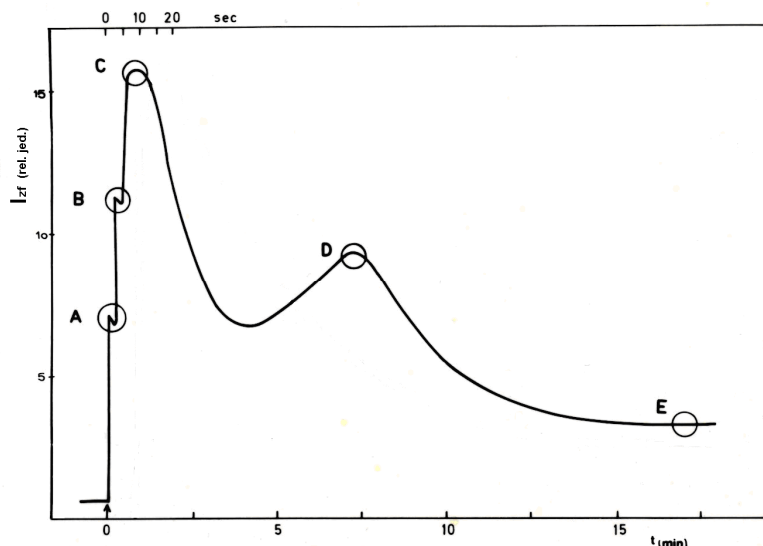


Slika 1. Principijelna šema fotosintetično-fluorescentnog metoda i aparature za merenje zakasnele fluorescencije hlorofila: C - mračna komora sa postoljem za uzorke; S - uzorak (segment intaktnog lista), filteri, ELS - izvor ekscitirajuće svetlosti, PH - fotomultiplikator; O - osciloskop, R - pisac, ELB - ekscitirajući zrak, DF - luminescentna svetlost (zakasnela fluorescencija), IS - ulazni prorez u mračnu komoru, OS - izlazni prorez iz komore

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

Rezultati i diskusija

Razlaganje indukcionih procesa zakasnele fluorescencije hlorofila na tranzijente. - Do razlaganja indukcionih procesa ZF hlorofila na tranzijente: A, B, C, D i E dolazi kada se intaktni segment lista kukuruza drži u mračnoj komori fosforoskopa znatno kraće vreme τ ($30 \text{ s} \leq \tau \leq 240 \text{ s}$) pre njegovog intermitentnog



Slika 2. Šematski prikaz mogućih mesta pojave oscilacija i nastajanja tranzijenata: A, B, C, D i E indukcionih procesa zakasnele fluorescencije hlorofila intaktnog lista linija i hibrida kukuruza u pobuđenoj tilakoidnoj membrani. Strelica označava početak merenja.

Schematic illustration of possible sites of the oscillation generation and the formation of transients: A, B, C, D, E of the induction processes of delayed chlorophyll fluorescence in the intact leaf of maize inbreds and hybrids in the excited thylakoid membrane

osvetljavanja sa belom svetlošću (Slika 2).

Rezultati eksperimentalnog razlaganja indukcionih procesa ZF hlorofila na tranzijente: A, B, C, D i E dati su na Slikam 3 a-c i 4a-f i u Tabeli 1.

Kritična temperatura faznih prelaza pobuđene tilakoidne membrane i energija aktivacije tranzijenata indukcionih procesa zakasnele fluorescencije hlorofila. - U Tabelama 2 i 3 dati su rezultati kritičnih temperatura faznih prelaza pobuđene tilakoidne membrane i energija aktivacije (E_a) tranzijenata B, C, D i E indukcionih procesa ZF hlorofila. Primenom Arenijusovog kriterijuma na temperaturnu zavisnost indukcionih tranzijenata utvrđene su kritične temperature faznih prelaza na kojima dolazi i do najmanjih strukturnih promena u tilakoidnoj membrani proučavanih linija i hibrida kukuruza. Vrednosti kritičnih temperatura u $^{\circ}\text{C}$ ukazuju na složenost fotosintetično-fluorescentnih procesa u tilakoidnoj membrani, ali i na pojavu otpornosti i adaptivnosti ispitivanih linija i hibrida kukuruza prema delovanju faktora sredine **Radenović i sar.**, 2001 (Tabela 2). Dobile vrednosti E_a pri nastajanju tranzijenata B, C, D i E i indukcione krive ZF hlorofila ukazuju da porast temperature dovodi do manjih ili većih strukturnih promena kod molekula (pretežno hlorofila) u pobuđenoj tilakoidnoj membrani, usled kojih, ti molekuli, postaju reaktivniji i stiču dodatnu E_a , koju koriste u rekombinacionim indukcionim procesima ZF hlorofila **Radenović**, 1997, **Radenović i sar.**, 2007b.

Tabela 1. Vremenski parametri tranzijenata: A, B, C, D i E indukcionih procesa zakasnele fluorescencije hlorofila kod intaktnog segmenta lista linija i hibrida kukuruza na 25°C.

Time Parameters of Transients: A, B, C, D and E of the Induction Processes of Delayed Chlorophyll Fluorescence in the Intact Leaf of Maize Inbreds and Hybrids at 25°C

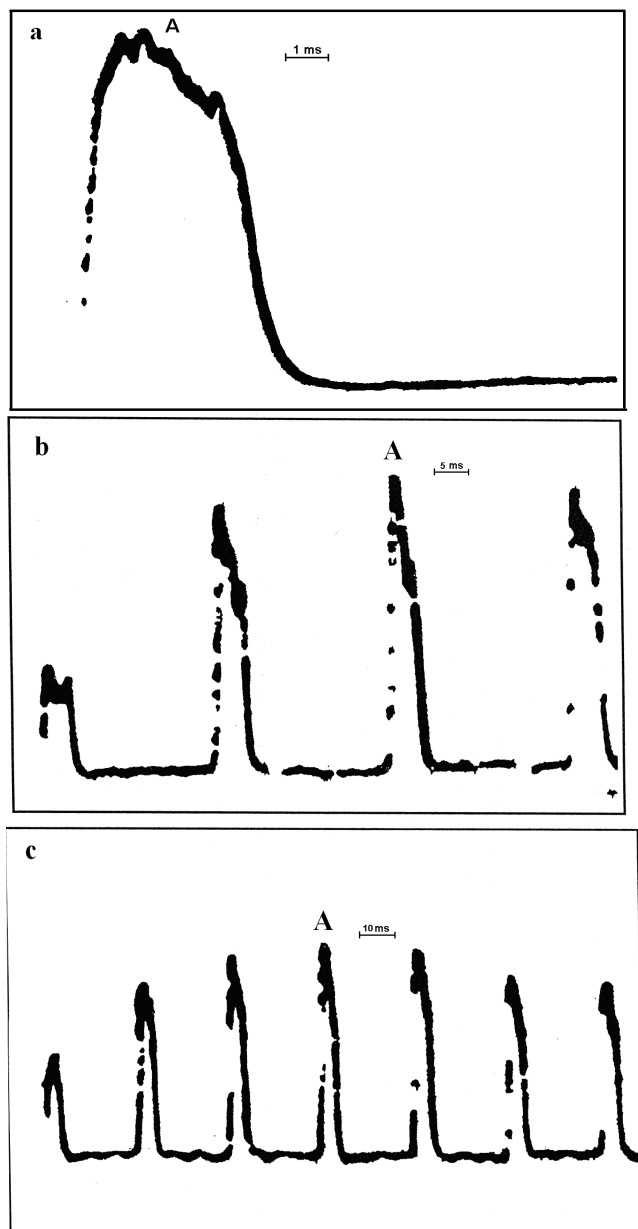
Vremenski parametri tranzijenata: A, B, C, D i E Time of generation of transients: A, B, C, D and E	Tranzijenti indukcionih procesa zakasnele fluorescencije hlorofila intaktnog segmenta lista linija i hibrida kukuruza Transients of the induction processes of delayed chlorophyll fluorescence in the intact leaf of maize inbreds and hybrids				
	A: t _A , ms	B: t _B , s	C: t _C , s	D: t _D , s	E: t _E , s
Vreme početka nastajanja tranzijenta Time of the beginning of transient generation	2-4	0,8-1,0	9-11	110-130	180-240
Najduže vreme trajanja tranzijenata Longest time of transient generation	75-80	8-9	21-23	480-500	8400
Prosečno vreme trajanja tranzijenata Average time of transient generation	31±6	5±0,5	15±5	360±20	670±35

Međuzavisnost tranzijenata i oscilacija u pobuđenoj tilakoidnoj membrani indukcionih procesa zakasnele fluorescencije hlorofila. - Eksperimentalni rezultati o međuzavisnosti intenziteta tranzijenata B, C, D i E i oscilacija u indukcionim procesima ZF hlorofila kod linija i hibrida kukuruza dati su na Slikama 5-8.

Ako se ispitivane linije i hibridi kukuruza gaje u uslovima različitog intenziteta vazdušne suše, onda se dobijaju fluorescentni odgovori indukcionih procesa ZF, ne samo u vidu tranzijenta, nego i sa pojavom oscilacija.

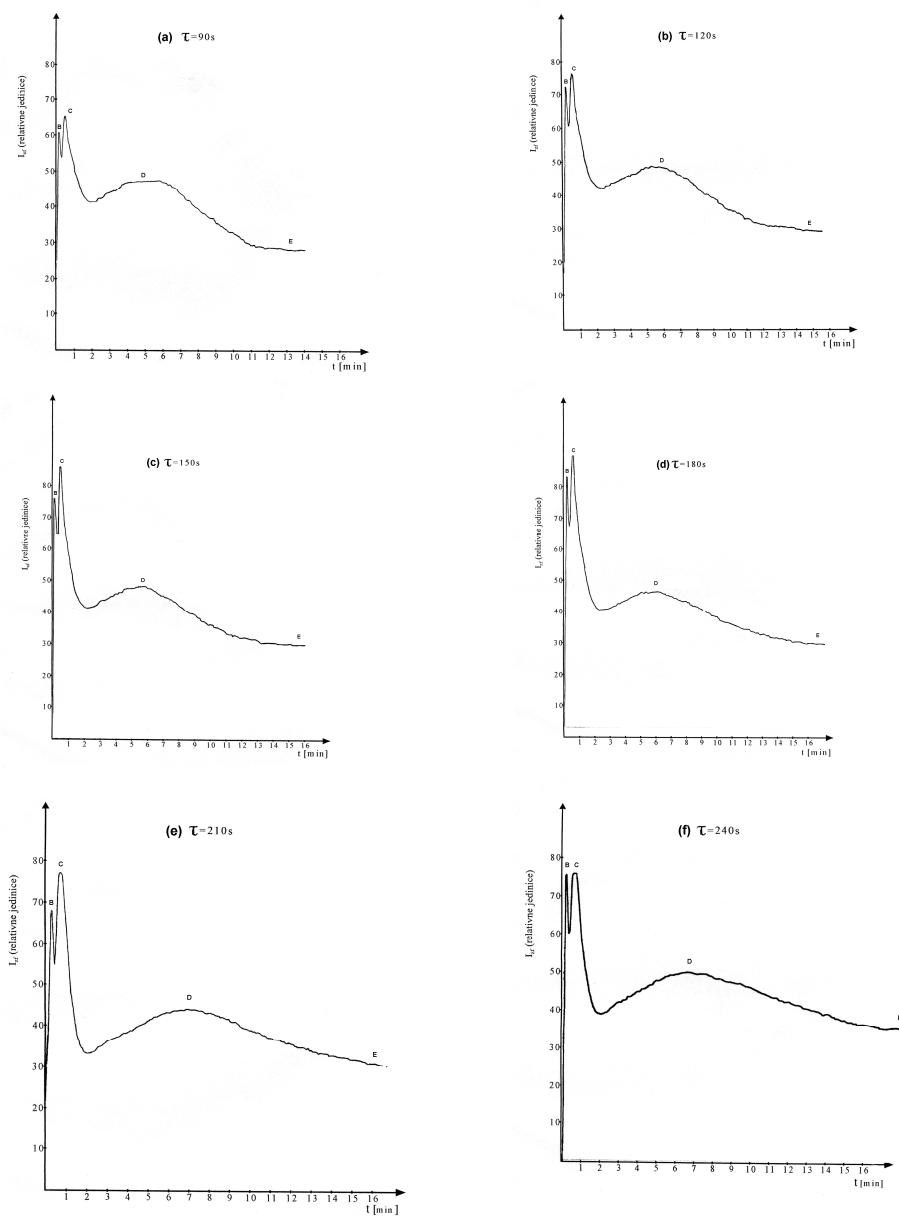
Kada su ovakva ispitivanja u pitanju, onda se radi o međuzavisnosti intenziteta tranzijenata: B, C, D i E indukcionih procesa ZF hlorofila sa izazivanjem i uspostavljanjem procesa nestabilnosti, fluktuacija i oscilacija u pobuđenim tilakoidnim membranama intaktnog lista linija i hibrida kukuruza (Slike 5-8).

U eksperimentalnom razlaganju indukcionih procesa ZF hlorofila prvo su otkriveni tranzijenti: B, C, D i E, primenom standardnih postupaka registrovanja ZF hlorofila. Znatno kasnije, otkriven je tranzijent A, **Radenović**, 1997. Njega je bilo znatno teže registrovati. Bilo je neophodno obezbediti Storage osciloskop i povezati ga u blok shemu aparature za registrovanje indukcionih procesa ZF hlorofila (Slika 1). Registrovanje tranzijenata indukcionih procesa: A, B, C, D i E karakterišu



Slika 3a-c. Eksperimentalno registrovanje tranzijenta A indukcionih procesa zakasnele fluorescencije hlorofila na intaktnom listu linija i hibrida kukuruza uz primenu Storage osciloscopa i sa vremenskom skalom od 1ms, 5 ms, 10 ms.

Experimental detection of the transient A of the induction processes of delayed chlorophyll fluorescence in the intact leaf of maize inbreds and hybrids with the use of the storage oscilloscope and a time scale of 1ms, 5ms and 10ms



Slika 4a-f. Eksperimentalni rezultati o razlaganju indukcionih krive zakasnele fluorescencije hlorofila na tranzijente: B, C, D i E za sledeće vrednosti τ : 90s, 120s, 150s, 180s, 210s i 240s.

Experimental results on the resolution of the induction curve of delayed chlorophyll fluorescence into transients: B, C, D and E for the following values of τ : 90s, 120s, 150s, 180s, 210s and 240s.

Tabela 2. Kritične temperature faznih prelaza tranzijenata: B, C, D i E indukcionih procesa zakasnele fluorescencije hlorofila intaktnog lista linija i hibrida kukuruza u zavisnosti od vremena (τ)

Critical Temperatures of the Transition Period of Transients: B, C, D and E of Delayed Chlorophyll Fluorescence Induction Processes in the Intact Leaf of Maize Inbreds and Hybrids in Dependence on Time (τ)

Vreme prethodnog držanja intaktnog lista u mraku (τ , s) Previous intact leaf dark period (τ , s)	Kritične temperature faznih prelaza, °C Critical temperatures of transition period, °C			
	Tranzijenti - Transients			
	B	C	D	E
30	33,3±0,2	28,5±2,5	31,6±0,2	30,8±0,2
60	23,4±0,3	32,7±3,0	25,4±0,3	22,0±0,3
90	19,5±0,2	25,8±0,3	26,5±0,2	20,5±0,4
120	17,9±0,2	25,0±0,5	22,5±0,2	21,0±0,4
150	24,7±0,4	26,3±0,4	22,5±0,2	25,0±0,3
180	24,0±0,3	26,3±0,3	23,1±0,2	23,8±0,5
210	24,3±0,3	31,0±0,4	22,0±0,2	22,2±0,3
240	26,1±0,3	32,0±0,4	23,8±0,2	22,8±0,5

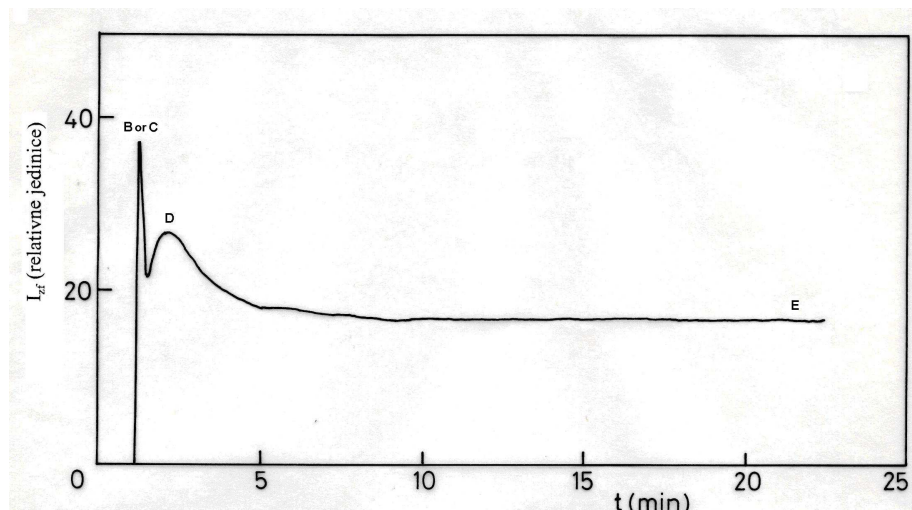
Tabela 3. Energija aktivacije tranzijenata: B, C, D i E indukcionih procesa zakasnele fluorescencije hlorofila intaktnog lista linija i hibrida kukuruza u zavisnosti od vremena (τ)

Activation Energy of Transients: B, C, D and E of Delayed Chlorophyll Fluorescence Induction Processes in the Intact Leaf of Maize Inbreds and Hybrids in Dependence on Time (τ)

Vreme prethodnog držanja intaktnog lista u mraku (τ , s) Previous intact leaf dark period (τ , s)	Energija aktivacije (E_a , kJ/mol) Activation energy (E_a , kJ mol ⁻¹)			
	Tranzijenti - Transients			
	B	C	D	E
30	65,37	83,69	266,98	32,08
60	32,90	23,80	39,66	26,28
90	51,81	14,03	27,83	53,68
120	52,96	47,68	63,68	92,53
150	30,07	68,52	93,53	106,62
180	25,97	75,05	116,27	106,32
210	22,35	34,43	132,19	92,74
240	21,60	30,09	131,80	74,49

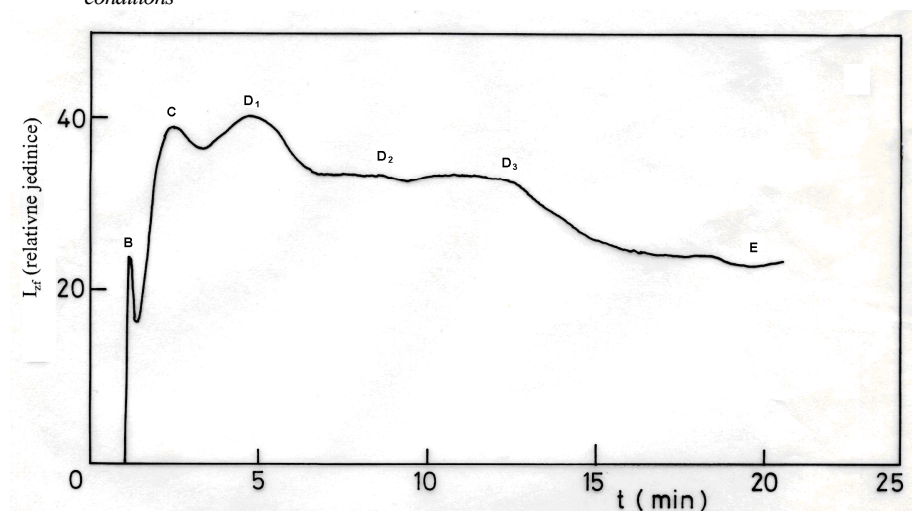
njihovi opšti i fizičko-hemijski parametri, i to: vremenski parametri tranzijenata (vreme početka nastajanja tranzijenata i vreme trajanja tranzijenata), promene intenziteta i mehanizmi njihovog nastajanja (Tabela 1).

Mehanizmi nastajanja tranzijenata A, B, C, D i E. - Mehanizam nastajanja tranzijenta A objašnjava se njegovom povezanošću sa primarnim fotohemijskim aktom koji se, prvenstveno ispoljava na pojavu indukcije dipola u reakcionom centru fotosistema II (PS II), *Jurisnic* i *Govindjee*, 1982, *Jurisnic*, 1986. Nastajanje ovog tranzijenta javlja se kao rezultat orijentacije električnih dipola u pobuđenoj tilakoidnoj membrani pod dejstvom bele svetlosti koja ih pobuđuje u intermitentnom



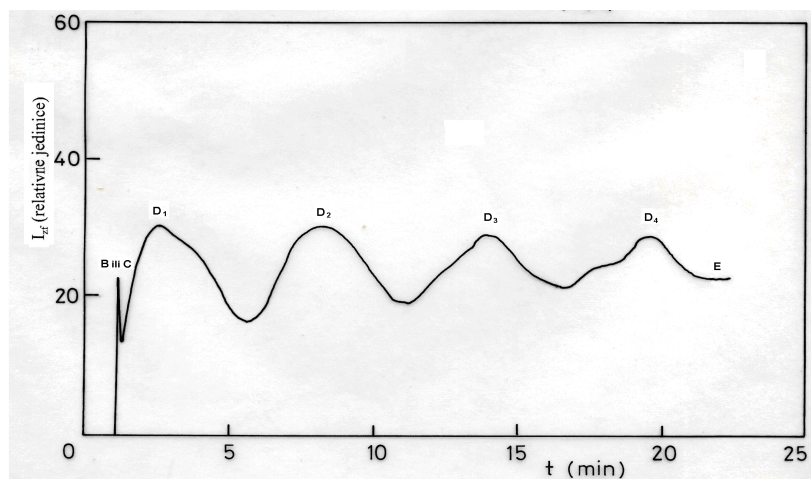
Slika 5. Nastajanje uobičajene indukcionne krive zakasnele fluoroscencije hlorofila sa tranzijentima B ili C, D i E kod intaktnog lista linija i hibrida kukuruza gajenih u normalnim fiziološkim uslovima

Generation of the standard induction curve of delayed chlorophyll fluorescence with transients B or C, D and E in the intact leaf of maize inbreds and hybrids grown under common physiological conditions



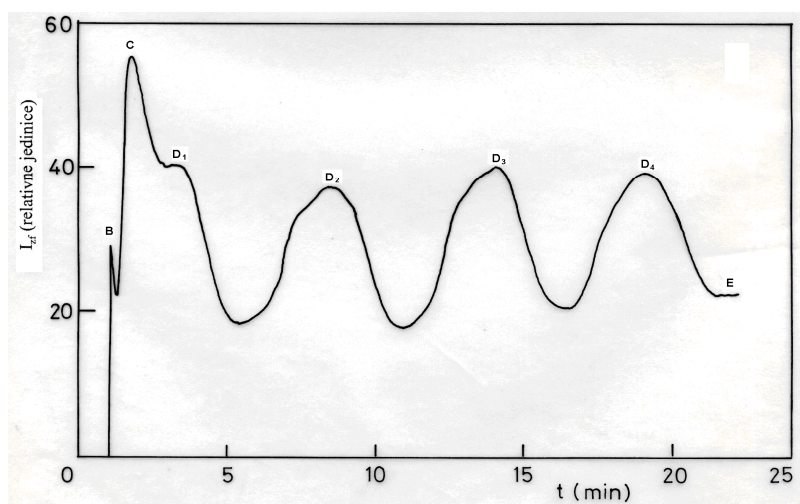
Slika 6. Nastajanje pojave nestabilnosti indukcionih procesa zakasnele fluoroscencije hlorofila sa tranzijentima B, C, D₁, D₂, D₃ i E kod intaktnog lista linija i hibrida kukuruza gajenih u uslovima slabe vazdušne suše

Generation of instability of the induction curve of delayed chlorophyll fluorescence with transients B, C, D₁, D₂, D₃ and E in the intact leaf of maize inbreds and hybrids grown under conditions of weak air drought



Slika 7. Nastajanje pojave fluktuacije indukcijske krive zakasnele fluoroscencije hlorofila sa tranzijentima B ili C, D₁, D₂, D₃, D₄ i E kod intaktnog lista linija i hibrida kukuruza gajenih u uslovima jače vazdušne suše

Generation of the fluctuation of the induction curve of delayed chlorophyll fluorescence with transients B or C, D₁, D₂, D₃, D₄ and E in the intact leaf of maize inbreds and hybrids grown under conditions of severe air drought



Slika 8. Nastajanje pojave oscilovanja indukcijske krive zakasnele fluoroscencije hlorofila sa tranzijentima B, C, D₁, D₂, D₃, D₄ i E kod intaktnog lista linija i hibrida kukuruza gajenih u uslovima jake vazdušne suše i umanjene vode u podlozi

Generation of the oscillations of the induction curve of delayed chlorophyll fluorescence with transients B, C, D₁, D₂, D₃, D₄ and E in the intact leaf of maize inbreds and hybrids grown under conditions severe air drought and reduced water in the medium

režimu. Orijentacija dipola stvara električno polje. Dipoli kao takvi, opredeljuju tranzijent A i ukazuju da je on fizičke prirode i da utiče na indukcijske procese ZF hlorofila, **Radenović**, 1997.

Nastajanje tranzijenta B dovodi se u najužu vezu sa uspostavljenjem elektrohemijskog gradijenta kroz pobuđenu tilakoidnu membranu posle intermitentnog osvetljavanja sa belom svetlošću intaktnog segmenta lista. Preciznije, ovaj tranzijent jako zavisi od električne komponente elektrohemijskog gradijenta ($\Delta\Psi$), **Radenović**, 1994, **Veselovski i Veselova**, 1990, **Radenović i sar.**, 1994a, 1994b. Tranzijent B se javlja posredno kao proizvod ekscitacije pobuđene tilakoidne membrane pod dejstvom bele svetlosti u intermitentnom režimu. Smatra se da tada dolazi do interakcije fotodipola sa drugim membranskim strukturama i da ovo uzajmno delovanje izaziva ekscitaciju koja se u stvari ispoljava kao tranzijent B indukcijskih procesa ZF hlorofila. Njegova osnova nije čisto hemijske prirode, jer se odigrava vrlo brzo, brže od hemijskih reakcija. Stoga se može pre reći da kod njega prevladava fizička priroda, **Radenović**, 1997, **Radenović i sar.**, 2007a.

Smatra se da pojava tranzijenta C zavisi od reakcionih centara koji su fotosenzitivni. Ovi centri zavise od τ (vreme držanja ispitivanog intaktnog segmenta lista u mraku), odnosno njihov broj se povećava u zavisnosti od τ , a zatim dolazi i do konformacionih i funkcionalnih promena određenih proteinskih struktura koje detmirišu međusobni položaj akceptora (Chl a) u reakcionom centru [5], [7], [8]. Ovaj tranzijent ima kinetički karakter sličan tranzijentu B pošto je i njegovo ponašanje osetljivo na prisustvo valinomicina, sposobnog da eliminiše elektrohemijski gradijent, **Radenović**, 1994, **Veselovski i Veselova**, 1990, **Radenović i sar.**, 1994b. Tranzijent C zavisi od elektronskog transporta između dva fotosistema (PS II i PS I), **Marković i sar.**, 2001. Preciznije, intenzitet ovog tranzijenta se povećava sa porastom akumulacije X^- (sekundarni akceptor elektrona PS I u redukcionoj formi sve dok ne dostigne maksimum koji odgovara maksimumu elektrohemijskog gradijenta). Akumulacija X^- odgovara akumulaciji Ph^- i Q^- forme PS II. Na sličan način, pad intenziteta tranzijenta C izazvan je smanjenjem električne komponente elektrohemijskog gradijenta ($\Delta\Psi$), te kao rezultat difuzije katjona iz tilakoida, u stvari je indikacija rasipanja elektrohemijskog gradijenta **Marković i sar.**, 2001. Kinetičko ponašanje ovoga tranzijenta zavisi od dužine tamnog perioda vremena. Produžavanje vremena mraka dovodi do smanjenja intenziteta tranzijenta C i istovremno do porasta intenziteta tranzijenta D.

Tranzijent D indukcijske krive ZF hlorofila se pojavljuje, a time i lako registruje, samo kada se njegovo ispitivanje vrši van optimalnog temperaturnog opsega $16^\circ < t < 28^\circ$ C. Dakle, ovaj tranzijent prvenstveno zavisi od temperature. Tranzijent D takođe zavisi od elektrohemijskog gradijenta, posebno od njegovog protonskog dela (ΔpH). Formiranje elektrohemijskog gradijenta odgovara "energizaciji" tilakoida, koji su dinamički entiteti, a čije strukture i funkcionalne karakteristike reaguju na stimulanse iz okoline, **Radenović**, 1997, **Marković i sar.**, 1999, 2001. Tako bi, u slučaju porasta amplitude tranzijenta D odgovarale promene u strukturi tilakoida koje su nastale tokom protonacija i fosforilacija. U slučaju pada tranzijenta D impliciraju se takve promene u strukturi tilakoida koje uslovljavaju

Tabela 4. Konstante brzina hemijskih reakcija u pobuđenoj tilakoidnoj membrani intaktnog lista linija i hibrida kukuruza za tranzijente C i D indukcionih procesa zakasnele fluorescencije hlorofila na 25 °C

Rate Constants of Chemical Reactions in the Thylakoid Membrane of the Intact Leaf of Maize Inbreds and Hybrids for Transients C and D of Delayed Chlorophyll Fluorescence Induction Processes at 25°C

Intaktni list linija i hibrida kukuruza Intact leaf of maize inbreds and hybrids	Konstante brzina hemijskih reakcija Rate constants of chemical reactions	
	Tranzijent C Transient C	Tranzijent D Transient D
	ZP 360	$k_{C1} = 5,05 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ $k_{C2} = 2,35 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
ZP 46A	$k_{C1} = 5,41 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ $k_{C2} = 6,13 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$k_{D1} = 4,88 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ $k_{D2} = 2,10 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
ZP 633	$k_{C1} = 2,62 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ $k_{C2} = 3,06 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$k_{D1} = 3,35 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ $k_{D2} = 4,10 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
ZP 704	$k_{C1} = 2,60 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ $k_{C2} = 8,30 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$k_{D1} = 3,70 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ $k_{D2} = 3,20 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
ZPR 70ž	$k_{C1} = 4,80 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ $k_{C2} = 6,10 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$k_{D1} = 3,50 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ $k_{D2} = 3,20 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
Oh 43	$k_{C1} = 5,10 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ $k_{C2} = 6,30 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$k_{D1} = 4,60 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ $k_{D2} = 2,90 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$

uzajamno približavanje PS I i PS II i olakšavaju intersistemski prenos elektrona. Nađeno je da se tranzijenti C i D mogu kinetički izraziti pomoću dve konsektivne hemijske reakcije prvog reda sa različitim konstatama brzine (Tabela 4).

Prilikom registrovanja svih indukcionih signala zakasnele fluorescencije hlorofila redovno se uspostavlja stacionarni nivo ZF hlorofila, koji je u slučaju procedure njegovog razlaganja, označen kao tranzijent E, **Radenović**, 1997. Stacionarni nivo indukcionih krive ZF hlorofila uspostavlja se padom elektrohemijjskog gradijenta kroz tilakoidnu membranu i odražava spore promene u intenzitetu indukcionih procesa ZF hlorofila. Stacionarni nivo indukcionih krive ZF hlorofila generalno raste sa porastom temperature, **Marković i sar.**, 1999. Međutim, stacionarni nivo indukcionih procesa ZF hlorofila dosta zavisi od stanja fotosintetskih struktura ispitivanih intaktnih listova linija i hibrida kukuruza. Pod određenim uslovima, uz delovanje faktora spoljašne sredine, tranzijent E može poprimiti oscilatorna svojstva, **Radenović i sar.**, 1981.

Indukcioni procesi ZF hlorofila, izloženih u vidu tranzijenata: A, B, C, D i E, koji nastaju u zavisnosti od τ ($30 \text{ s} \leq \tau \leq 240 \text{ s}$) vrlo su složeni, osetljivi i traju kratko vreme (Tabela 1). Imajući to u vidu, kritične temperature faznih prelaza u pobuđenoj tilakoidnoj membrani nisu se ispolile sa većim razlikama, (Tabela 2). To isto važi i za E_a , (Tabela 3). Pored toga, ovakvim ponašanjem pobuđene tilakoidne membrane doprinosi se interakciji tranzijenata i oscilacija unutar indukcionih procesa u ZF hlorofila, te i to utiče na odsustvo većih promena kod E_a , (Tabela 3).

Međuzavisnost tranzijenata i oscilacija indukcionih procesa zakasnele fluorescencije. - Proučavanje oscilatornih pojava u biološkim sistemima, a posebno u fotosintetičnim strukturama je relativno nova tematika, **Radenović**, 2001. Veliki broj pitanja iz domena oscilatornih pojava tek što je postavljeno, započeto ili samo delimično obrađeno. Naime, radi se o međuzavisnosti tranzijenata indukcionih procesa ZF hlorofila sa izazivanjem i uspostavljanjem nestabilnosti, fluktuacija i oscilacija kod pobuđenih tilakoidnih membrana intaktnog segmenta lista kukuruza. Ovakav odgovor dobijen je kod linija i hibrida kukuruza koje su tolerantne i otporne na sušu, **Radenović i sar.**, 1981, 2001.

Proučavanjem indukcionih procesa ZF hlorofila kod intaktnog lista kukuruza, koji je gajen u normalnim i fiziološkim uslovima dobija se odgovor u vidu indukcionih krive ZF hlorofila kod koje su se tranzijenti samo delimično ispoljili (Slika 5). Kod njih nema pojava nestabilnosti, fluktuacije i oscilacija. Međutim, ako se ispitivani objekti gaje u uslovima slabe vazdušne suše, onda se dobijaju fluorescentni odgovori sa ritmičnim karakterom, koji znatno odstupaju od uobičajene indukcionih krive ZF hlorofila.

Jedan od takvih odgovora sa oscilatornim karakterom indukcionih procesa ZF hlorofila, može imati nestabilnosti indukcionih krive ZF hlorofila koje se zadržava u predelu njenog stacionarnog nivoa na koje tranzijenti imaju uticaja (Slika 6). Pojava ritmova može se javiti i u formi fluktuacija indukcionih krive ZF hlorofila na koje tranzijenti mogu imati znatnijeg uticaja (Slika 7).

Na kraju, pojava oscilovanja indukcionih krive ZF hlorofila može se ispoljiti i u vidu jedne pravilne oscilacije stacionarnog nivoa zakasnele fluorescencije hlorofila (Slika 8).

Međuzavisnost tranzijenata indukcionih procesa ZF hlorofila sa pojavama nestabilnosti, fluktuacija i oscilovanja teško je objasniti. Ipak, smatramo da tranzijenti B, C i D iniciraju i provociraju navedene pojave. Ovde će ukratko biti data dva objašnjenja njihove međuzavisnosti.

Prvo objašnjenje bazira se na postojanju strukturno-funkcionalne regulacije u sistemu pobuđenog hloroplasta intaktnog lista kukuruza pri njihovom formiranju. Po našoj hipotezi, ovo objašnjenje počiva na postojanju aktivnih povratnih veza u sistemu koji funkcioniše u fluktuaciono-ritmičnom režimu. To znači da se, u uslovima kada fotosintetizujući aparat intaktnog lista funkcioniše u zavisnosti od faktora spoljašnje sredine, pojavljuje periodičnost (ritmičnost) vremenske zavisnosti strukturnih i funkcionalnih parametara lista kukuruza.

Drugo objašnjenje polazi od pretpostavljenog tečno-mozaičnog membranskog modela u kojem se pojave nestabilnosti, fluktuacije i oscilovanja dovode u vezu sa pobuđenim stanjem tilakoidne membrane. Pobuđeno stanje tilakoidne membrane podrazumeva složene konformacione promene njenih konstituenata, a time i značajne promene funkcionalne međuzavisnosti, koje iz toga proizilaze. Naime, na površini tilakoidne membrane dolazi do migracije proteina (promene površinske gustine naelektrisanja) koji izazivaju transportne procese K^+ , Na^+ , H^+ i Cl^- , **Radenović**, 1994. Sasvim je moguće očekivati da se transportni procesi jona, u sastavu tilakoidne membrane, i kroz nju samu, odražavaju na

stabilnost stacionarnog nivoa indukcionih krive ZF hlorofila, i to tako da ona poprma svojstva oscilatora, **Kalauzi i sar.**, 2006, **Radenović i sar.**, 1981, 2007a. Ovdje treba napomenuti da jedan od puteva normalizovanja strukture i funkcije pobuđene tilakoidne membrane ide preko procesa oksidovanja fosfolipida, a zatim i preko procesa resinteze neoksidovanih produkata. Ovim činjenicama ide u prilog i saznanje da su aktivni transport i pasivni izlazak katjona i anjona tesno povezani sa periodičnošću procesa hidrolize i resinteze fosfolipida, kao i da utiču na delovanje makroenergetskih jedinjenja (ATP i ADP) u pobuđenoj tilakoidnoj membrani, koja može da ispolji nestabilnosti, fluktuacije i oscilacije kao i da poprmi svojstvo univerzalnog oscilatora, te da ih prenese i na indukcionih procese ZF hlorofila, **Radenović**, 2001, **Kalauzi i sar.**, 2006, **Radenović i sar.**, 1981, 2007a.

Zaključak

Na osnovu izloženih rezultata proučavanja i njihove diskusije može se konstatovati da poboljšani fotosintetično-fluorescentni metod može da se uspešno primeni u izučavanju indukcionih procesa ZF hlorofila, koji su razloženi na tranzijente A, B, C, D i E i kod kojih mogu da nastanu oscilacije.

Međuzavisnost tranzijenata i oscilacija indukcionih procesa A, B, C, D i E javlja se kod intaktnih listova linija i hibrida kukuruza koji su gajeni u staklari u uslovima različite vazdušne suše, delovanja temperature i deficita vode u podlozi, kada su im tilakoidne membrane pobuđene i kod kojih je došlo do značajnih strukturnih i funkcionalnih promena.

Utvrđeno je postojanje tranzijenata: A, B, C, D i E indukcionih procesa ZF hlorofila. Pokazani su vremenski i fizičko-hemijski parametri za navedene tranzijente. Objasnjeni su mehanizmi njihovog nastajanja. Utvrđene su karakteristike oscilatornog ponašanja indukcionih procesa ZF hlorofila. Dati su uslovi pri kojima dolazi do nastajanja nestabilnog stanja, pojava fluktuacija i uspostavljanja oscilacija u pobuđenoj tilakoidnoj membrani intaktnog lista linija i hibrida kukuruza. Izneta je hipoteza o mehanizmu nastajanja oscilacija i njihove međuzavisnosti sa tranzijentima indukcionih procesa ZF hlorofila.

Naznačenje

Za realizaciju ovih istraživanja najveća finansijska sredstva ulagao je Institut za kukuruz "Zemun Polje", Beograd, a delimično i Ministarstvo za nauku Srbije (projekti: 03E22, 12E11 i 142025).

Literatura

- Jurisnic, P.** (1986): Delayed fluorescence, Current Concepts and Status. In: "Light Emission by Plants and Bacteria", Eds: Govindjee, J. Ames and C.D. Fork, Academic Press, Orlando, FL, USA, pp. 291-328.
- Jurisnic, P.** and **Govindjee** (1982): Effects of hydroxylamine and silicomolybdate on the decay in delayed light emission in the 6-100 μ s range after a single 10 ns flash in pea thylakoides, *Photosynth. Res.* **3** (3): 161-177.
- Kalauzi, A. D. Marković** and **Č. Radenović** (2006): Transients of delayed fluorescence induction signal and photosynthetic antennas: a possible relationship. Mathematical modeling approach. *Russ. J. Plant Physiol.* **53** (3): 289-297.
- Marković, D., M. Jeremić, Č. Radenović** and **Ž. Vučinić** (1987): A study of temperature induced structural change in photosynthetic system using delayed fluorescence. *J. Serb. Chem. Soc.* **52**: 331-336.
- Marković, D., A. Kalauzi** and **Č. Radenović** (2001): Delayed fluorescence induction transients: mathematical modelling based on the chosen kinetic models. *Gen. Physiol. Biophys.* **20**: 303-313.
- Marković, D., Č. Radenović, L. Rafailović, S. Žeraić** and **M. Marković** (1999): Temperature dependence of delayed fluorescence induction curve transients. *Gen. Physiol. Biophys.* **18** (3): 257-267.
- Radenović, Č.** (1994): A study of delayed fluorescence in plant models: photosynthetic, transportation and membrane processes. *J. Serb. Chem. Soc.* **59** (9): 595-617.
- Radenović, Č.** (1997): Induction processes and activation energy of delayed chlorophyll fluorescence. *Proceedings for Natural Sciences of Matica Srpska* **93**: 5-14.
- Radenović, Č.** (2001): The mechanism of oscillatory ion transport and biopotential across excited cell membrane. *Proceedings for natural sciences of Matica Srpska* **100**: 91-104.
- Radenović, Č.** and **M. Jeremić** (1996): The study of delayed light emission in plant models. *Arch. Biol. Sci.* **48** (1-2): 1-18.
- Radenović, Č., M. Jeremić, D. Fidler, D. Marković** and **Ž. Vučinić** (1985): A kinetic study of delayed fluorescence induction and its dependence on preceding darkness. *Period. biol.* **87** (2): 304-306.
- Radenović, Č., M. Jeremić** i **D. Marković** (1994a): Фотоиндукционная биолюминесценция растительных систем: фотосинтетические, транспортные и мембранные процессы. *Физиология и биохимия культурных растений* **26** (5): 419-433.
- Radenović, Č., A. Kalauzi, K. Konstantinov** and **G. Drinić** (2007a): Dynamics of generating transients of delayed fluorescence induction signal and photosynthetic antennas: a possible relationship. Mathematical modeling approach. *Proc. Nat. Sci. Matica Srpska* **112**: 5-26.

- Radenović, Č., K. Konstantinov, N. Delić and G. Stanković** (2007b): Photosynthetic and bioluminescence properties of maize inbred with upright leaves. *Maydica* 52: 347-356.
- Radenović, Č., D. Marković and M. Jeremić** (1994b): Delayed chlorophyll fluorescence in plant models. *Photosynthetica* 30 (1) 1-24.
- Radenović, Č., I. Štarić, M. Ivanović i L. Kojić** (2001): Биоллюминесцентный отзв инбредных линий кукурузы (*Zea mays* L.) на температуру и засуху. Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук 4: 13-16.
- Radenović, Č., Ž. Vučinić, D. Fidler and M. Penčić** (1981): Contribution to the study of delayed light emission rhythms in the maize leaf (*Zea mays* L.). *Studia biophys.* 86 (2): 143-147.
- 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): Luminiscent Characteristic of Plants Photosynthetic Apparatus. In: "Luminiscence of Plants", ed. Nauka, Moscow, pp. 8-78.

Primljeno: 15.12.2008.

Odobreno: 30.12.2008.

* *
*

Mechanisms and Parameters of Transients and Oscillations of Delayed Chlorophyll Fluorescence Induction Processes in the Excited Thylakoid Membrane of the Maize Intact Leaf

- Original scientific paper -

Čedomir RADENOVIĆ^{1,2}, Milorad JEREMIĆ², Georgij MAKSIMOV³,
Miloš BELJANSKI⁴, Milomir FILIPOVIĆ¹ and Zoran ČAMDŽIJA¹

¹Maize Research Institute, Zemun Polje, Belgrade-Zemun

²Faculty of Physical Chemistry, University of Belgrade, Belgrade

³Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

⁴Institute of General and Physical Chemistry, Belgrade

S u m m a r y

The intact leaves of four maize hybrids: ZP 360, ZP 46A, Zp 633 i ZP 704 and two maize inbred lines ZPR 70ž i Oh 43, tolerant and resistant to the impact of increased and high temperatures and drought were observed in the present study. The improved, non-invasive photosynthetic-fluorescence method was applied in studying of complex delayed chlorophyll fluorescence induction processes that were resolved into transients: A, B, C, D and E in which instabilities, fluctuations and oscillations can occur.

The interrelationship between transients and oscillations of the delayed chlorophyll fluorescence induction processes occurred in the intact leaves of maize inbreds and hybrids that were grown in the green-house under conditions of different air drought, impacts of temperatures and the water deficit in the medium, when their thylakoid membranes had been excited and significant structural and functional changes had occurred.

The existence of transients: A, B, C, D and E of delayed chlorophyll fluorescence induction processes was determined. The time and physico-chemical parameters of these transients were presented. The mechanisms of their generation were explained. The properties of oscillatory performances of delayed chlorophyll fluorescence induction processes were determined. The conditions under which instable state and fluctuations occurred and oscillations were established in the excited thylakoid membrane of the intact leaf of maize inbreds and hybrids were presented. The hypothesis on the mechanism of establishing of oscillations and their interrelation with transients of delayed chlorophyll fluorescence induction processes was presented.

Received: 15/12/2008

Accepted: 30/12/2008

Adresa autora:

Čedomir RADENOVIĆ

Institut za kukuruz "Zemun Polje"

Slobodana Bajića 1

11185 Beograd-Zemun

Srbija

E-mail: radenovic@sbb.rs