



ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ

© А.М. Шимкевич¹, В.Н. Макаров², И.М. Голоенко¹, О.Г. Давыденко¹.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА У АЛЛОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ ЯЧМЕНЯ

¹Институт генетики и цитологии
Национальной академии наук
Беларусь

²Институт биофизики и
клеточной инженерии
Национальной академии наук
Беларусь

❖ У ряда аллоплазматических линий ячменя с помощью метода РАМ-флуориметрии изучались особенности функционирования фотосинтетического аппарата. Замещение ядерного генома оказывает неоднозначный эффект на изменение фотосинтетических параметров. Показана важность сбалансированности ядерной и органельных генетических систем растения для функционирования его фотосистемы II.

Ключевые слова: аллоплазматическая линия — alloplasmic lines, органельный геном — organelle genome, РАМ-флуориметрия — RAM fluorimetry, флуоресценция хлорофилла — fluorescence of chlorophyll, фотосинтетический аппарат — photosynthetic system, фотосистема II — photosystem II, ячмень — barley

ВВЕДЕНИЕ

Взаимодействие трех генетических систем (ядра, хлоропластов и митохондрий) растительной клетки является одной из самых важных и интересных проблем современной генетики [1, 2]. От скоординированности работы геномов ядра и цитоплазмы во многом зависит продуктивность растения и его приспособленность к факторам окружающей среды [3, 4]. Таким образом, исследования в этом направлении представляют не только теоретический, но и большой практический интерес, поскольку знания в этой области могут принести несомненную пользу при выведении новых высокопродуктивных сортов.

Удобной моделью для изучения взаимодействия ядерного и органельных геномов являются аллоплазматические линии, сочетающие в себе ядро одного и цитоплазму другого вида. Перевод ядерных генов на новую цитоплазму позволяет исследовать, с одной стороны, воздействие генетических факторов цитоплазмы на процессы экспрессии, рекомбинации и трансмиссии генов ядра, а, с другой стороны, дает возможность оценить вклад ядерного генома в регуляцию различных процессов, происходящих в хлоропластах и митохондриях [5, 6, 7]. Кроме того, такие линии с замещенными геномами сами по себе могут представлять немалый интерес в качестве селекционного материала.

Одним из важнейших процессов, происходящих в растительной клетке, является фотосинтез. Он играет ключевую роль в определении продуктивности растений и находится под кооперативным контролем генов ядра и хлоропласта. Для быстрого получения количественной и качественной информации, характеризующей процесс фотосинтеза, очень удобным методом является измерение флуоресценции хлорофилла (**ФлХл**). Используя флуоресцентные параметры быстрой и медленной составляющих кинетики индукции ФлХл, можно описывать особенности функционирования фотосинтетического аппарата (**ФСА**) при разнообразных внешних и внутренних условиях в интактных растениях.

В настоящей работе исследуются содержание хлорофиллов и каротиноидов, а также особенности функционирования ФСА ряда аллоплазматических линий ячменя. Сделана попытка оценить влияние замещения ядерного генома на работу хлоропластов растений.



МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили растения культурного ячменя *Hordeum vulgare* сортов Вежа, Визит, Роланд, три дикорастущие формы *H. spontaneum* — W3, W4, W8, а также аллоплазматические линии, сочетающие в себе ядерные геномы культурного и органельные геномы дикого ячменя. Замещенные линии создавались путем семикратного беккроссирования диких линий пыльцой сортов-доноров ядерных геномов.

Растения выращивали в горшках с автоклавированной (при давлении 0,8 атмосферы и температуре 140 °C в течение 20 минут) землей в климатической камере при следующих условиях:

- продолжительность светового дня — 16 часов;
- температура — 22 °C;
- освещённость — 7000 Люкс.

Для анализа брали 8-дневные (от момента посадки) растения.

Параметры индукции флуоресценции были измерены с помощью PAM-флуориметра по системе, разработанной Schreiber [8] и основанной на принципе модуляции импульсного возбуждения ФлХл. Анализ индукционных переходов переменной флуоресценции позволил рассчитать параметры, связанные с функционированием фотосистемы II (**ФС II**) [9, 10].

Количество фотосинтетических пигментов в ацетоновом экстракте определяли спектрофотометрически (спектрофотометр Uvikon-931, ФРГ) по формулам, предложенным Шлыком [11]. В статье представлены средние значения и их стандартные отклонения из трех биологических и статистических повторностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одной из характеристик ФСА зелёного растения, связанной с его продуктивностью, является состояние пигментной системы, в частности, количественный состав фотосинтетических пигментов.

В результате проведенных исследований было показано, что замещение ядерного генома оказывало неоднозначное воздействие на количественное содержание хлорофилла (Хл) в растениях аллоплазматических линий. Это проявлялось в различиях по содержанию пигментов как между аллолиниями с одинаковым ядерным и разными органельными геномами, так и между линиями, сочетающими разные геномы ядра с одними и теми же геномами органелл (рис. 1, таблица).

Так, влияние ядерного генома сорта Роланд на пластомы форм W3 и W8 носило негативный характер. Уровень хлорофиллов у линий Роланд (W3)

и Роланд (W8) снижался соответственно на 22 % и 14 % по отношению к исходным диким формам-донорам цитоплазмы. У аллолинии Визит (W8) содержание хлорофиллов падало на 37 % по отношению к исходной форме W8. Сочетание ядра сорта Визит и цитоплазмы дикой формы W4, наоборот, приводило к повышению данного показателя на 33 % на единицу сырой массы листа.

Аналогичные тенденции наблюдались в изменении содержания каротиноидов, принимающих активное участие в поглощении световой энергии и передаче её в реакционные центры фотосистемы и служащих фотопротекторами в тушении триплетного состояния Хл и синглетного кислорода, а также ингибирующих перекисное окисление липидов [12]. Изменения в содержании каротиноидов чаще оказывались достоверными, чем изменения в суммарном содержании хлорофиллов.

Величина отношения хлорофилла «а» к хлорофиллу «б» у исследованных растений ячменя варьировала в пределах от 2,3 до 3,1. Изменения этого соотношения были незначительны у замещённых линий с цитоплазматическими геномами W4 и W8 (в пределах 10 % в ту или иную сторону). Однако у аллолиний Визит (W3) и Роланд (W3) этот показатель увеличивался на 17 % и 31 % соответственно по отношению к дикой форме W3 за счет преимущественного накопления хлорофилла «а». Смещение данного соотношения в сторону увеличения содержания хлорофилла «а» связано, по-видимому, с преимущественной экспрессией хлоропластных генов, кодирующих апопротеины хлорофилл «а»-белковых комплексов ФСА у этих замещённых форм.

Кроме того, в исследуемых образцах ячменя был проведен анализ быстрой и медленной индукции флуоресценции хлорофилла «а». При этом не было обнаружено никаких значительных изменений по эффективности фотохимии ФС II — эффективный квантовый выход, линейная скорость электронного транспорта по цепи переносчиков, активность реакционных центров и емкость светособирающих комплексов (**ССК**) модифицированных линий мало отличались от таковых у исходных форм-доноров цитоплазмы.

Одной из характеристик потенциальной фотосинтетической активности растения в целом, основанной на флуоресцентных показателях, является «коэффициент жизнеспособности» или R/d -коэффициент, который проявляет высокую степень корреляции с ассимиляцией углекислого газа [13]. Чем ниже значение данного показателя, тем выше степень нефункциональности ФСА и, следовательно, всего растения в целом. При различных заданных усло-

виях развития фотосинтетическая активность хлоропласта может нарушаться. В таком случае на кинетической кривой индукции ФлХл наблюдается уменьшение максимума (F_m), и, как следствие, снижается «коэффициент жизнеспособности» и усвоение CO_2 в цикле Кальвина-Бенсона.

Было показано, что замещение ядерного генома диких форм ячменя на геном сорта Роланд вызывает увеличение Rfd -коэффициента до 27 %. Ядерный геном сорта Визит заметного эффекта не проявлял, а геном сорта Вежа угнетал фотосинтетическую активность по данному показателю до 33 % по отношению к исходным диким формам (таблица).

Кроме этого, комплексы ФС II могут отличаться между собой по структурно-функциональному состоянию, например, по способности к транспорту электронов между первичным (Q_A) и вторичным (Q_B) акцепторами хиноновой природы. Гетерогенность акцепторной стороны ФС-II основана на существовании комплексов, которые не могут передавать электроны между Q_A и Q_B . Их называют Q_B -невосстановливающие комплексы (центры) ФС II. Предполагается, что они являются резервным пулом для активных центров фотосистемы [14]. В нормальных условиях 15–30 % комплексов ФС II находятся в Q_B -невосстановливающем состоянии. При различных нарушениях количество невосстанавливющих центров возрастает [15, 16, 17].

Количественный анализ Q_B -невосстановливающих комплексов беккроссированных линий ячменя свидетельствует об отсутствии значительных повреждений системы акцептора. У всех аллолиний с ядром сорта Вежа отмечалось снижение количества

Q_B -невосстановливающих центров на 13–28 % по отношению к диким формам-донорам цитоплазмы. Уменьшение количества Q_B -невосстановливающих комплексов также наблюдалось при сочетании ядерного генома сорта Роланд с пластом формы W3, однако, сочетание того же ядра с цитоплазмой W8, напротив, приводило к некоторому увеличению данного показателя (таблица).

Выход флуоресценции может быть оценён с помощью механизмов, не связанных с редокс состоянием переносчика Q_A . Для того, чтобы избежать повреждения реакционных центров светом, интенсивность которого превышает возможности электронного транспорта, растения вынуждены частично диссирировать энергию поглощенных квантов света в виде тепла. Существует несколько компонентов нефотохимического тушения (NPQ), различающихся по скорости темновой релаксации [18]: qE — быстрый компонент, зависящий от трансмембранных градиентов протонов, и qI — медленный компонент, ассоциирующийся с фотоингибиторным повреждением комплексов ФС II. Отмечено увеличение параметра NPQ для хлоропластов аллоплазматической линии Визит (W3) (+ 18 %) за счет изменения градиента DpH на мембранах хлоропластов (+ 68 %), для линии Вежа (W4) (+ 39 %) за счет изменения DpH (+ 63 %). В хлоропластах аллолинии Роланд(пробел?) (W8) возрастание нефотохимического тушения ФлХл (+ 14 %) связано с фотоингибиторным повреждением комплексов ФС II (+ 66 %). На примере формы Роланд (W8) можно наглядно отметить работу компенсационных механизмов ФСА. На рис. 2 видно,

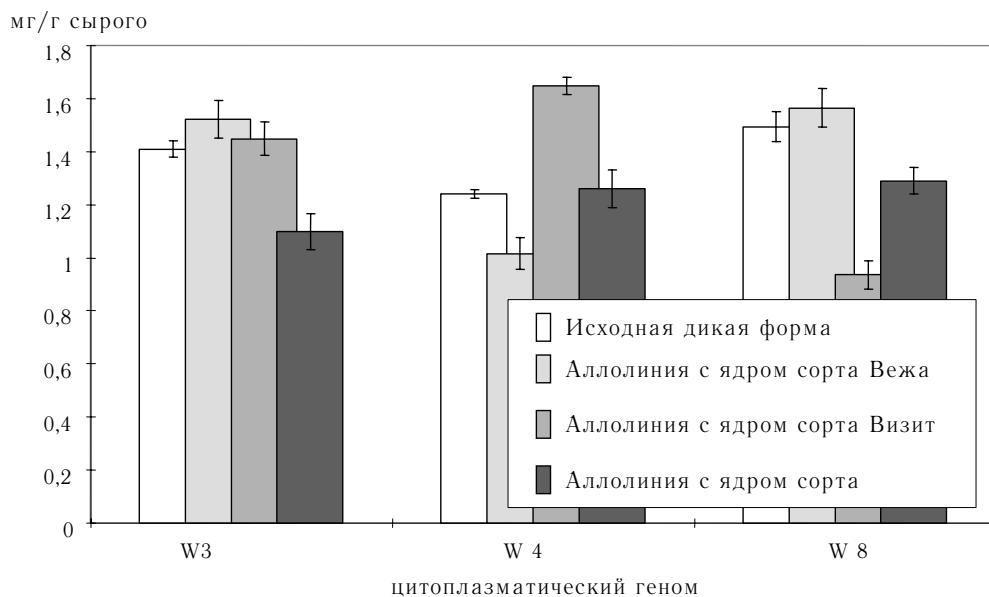


Рис. 1. Суммарное содержание хлорофиллов «а» и «б» у диких форм-доноров цитоплазмы и их аллоплазматических аналогов

Таблица

Изменение ряда фотосинтетических параметров (в %) у аллоплазматических форм ячменя при их сравнении исходными родительскими формами

Пара- метры	Аллоплазматическая линия																	
	Вежа(W3) ⁷	Визит(W3) ⁷	Роланд(W3) ⁷	Вежа(W4) ⁷	Визит(W4) ⁷	Роланд(W4) ⁷	Вежа(W8) ⁷	Визит(W8) ⁷	Роланд(W8) ⁷	Вежа (%)	W3 (%)	Визит (%)	W3 (%)	Роланд (%)	W3 (%)	Вежа (%)	W4 (%)	Визит (%)
В сравнении с родительской формой:																		
a	+ 35	+ 11	- 1	+ 8		- 6	- 5	- 7	+ 10	+ 28	+ 7	+ 2	+ 41	+ 3	- 38	- 40	+ 11	- 11
a + b	+ 43	+ 8	+ 1	+ 3	- 10	- 22	- 5	- 18	+ 15	+ 33	+ 3	+ 2	+ 47	+ 5	- 35	- 37	+ 5	- 14
кар	+ 52	+ 21	+ 19	+ 16	- 26	- 15	- 9	- 21	+ 40	+ 48	- 23	- 2	+ 52	+ 17	- 29	- 34	- 15	- 4
NPQ	д. о.	д. о.	- 4	+ 18	- 13	+ 4	+ 20	+ 39	д. о.	д. о.	- 4	+ 14	д. о.	д. о.	- 8	н. р.	+ 6	+ 14
Q _B	+ 13	- 20	- 37	- 36	- 30	- 30	+ 28	- 5	- 18	- 12	+ 11	+ 18	+ 15	- 2	- 28	- 11	+ 15	+ 41
spill	+ 2	+ 11	- 10	+ 10	+ 7	+ 25	- 15	- 14	- 18	- 8	- 20	- 14	- 9	- 19	- 14	- 14	+ 25	+ 20
Rfd	+ 4,2	+ 3,1	- 6,8	- 3,4	+ 8,0	+ 26,9	- 26,5	- 33,4	- 4,1	- 9,1	- 21,5	- 15,6	- 11,7	- 27,4	+ 17,8	+ 1,4	+ 25,2	+ 22,1

a – содержание хлорофилла «а» в мг/г сырого веса; a+b – суммарное содержание хлорофиллов «а» и «б» в мг/г сырого веса; кар – содержание каротиноидов в мг/г сырого веса; Q_B – количество Q_B-невосстановливающих центров ФС II; NPQ – уровень нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла; spill – индекс «spillover»; Rfd – коэффициент жизнеспособности; н. р. – нет различий; д. о. – данные отсутствуют; заливкой серого цвета отмечены статистически значимые (согласно значениям среднеквадратичного отклонения) изменения фотосинтетических параметров.

что кинетическая кривая фотохимического тушения флуоресценции (qP) у дикой формы W8 выходит на плато позже, чем кривая аллоплазматической линии Роланд (W8). Эта задержка свидетельствует о более медленной скорости включения в работу ферментов темнового цикла фотосинтеза, связанного с поглощением углекислого газа. Однако фотосинтетические преимущества аллоформы с ядерным геномом сорта Роланд, хотя и вызывают увеличение индекса жизнеспособности (Rfd) растения, приводят, как уже указывалось, к увеличению фотоингибиции ФС II, которое снимается за счет оттока электронов на ФС I (отношение Fm / Fo — индекс «spillover» увеличивается на 20 %) и за счет уменьшения ССК (количество Хл а снижается на 11 %).

К неоднозначным результатам приводит также сравнение аллоплазматических линий с сортами, служившими источниками ядерных геномов. Так, например, совмещение цитоплазмы W3 с различными ядрами не давало существенных отличий между аллолиниями и культурными сортами по Rfd -коэффициенту, в то время как изменения в суммарном содержании хлорофилла были достаточно заметны — от (- 10 %) до (+ 43 %). К заметному снижению коэффициента жизнеспособности приводил перевод ядерных геномов на цитоплазму W4 — до (-26,5 %) по отношению исходным сортам — донорам ядра. А вот сочетание ядерных геномов сортов Визит или Роланд с цитоплазматическим геномом линии W8, напротив, повышало данный показатель на 17,8 % и 25,2 % соответственно.

Анализируя полученные данные, можно сделать вывод о невозможности выделить «хорошую» или «плохую» цитоплазму относительно её селекционных преимуществ. Сочетание в аллоплазматической линии ядра и цитоплазмы, происходящих от родительских растений, относящихся к разным видам, может улучшать одни и ухудшать другие хозяйствственно важные параметры. Степень изменения, а, порой, сам набор изменяющихся показателей зависит не просто от вида ядра или цитоплазмы, а именно от их сочетания. Это хорошо видно на примере изменения у аллолиний содержания хлорофилла «а». Так, у линии Визит (W8) данный показатель достоверно снижался как по отношению к донору цитоплазмы (- 40 %), так и по отношению к донору ядра (-38 %). У линии Вежа(пробел?) (W8), напротив, по отношению к сорту Вежа наблюдалось достоверное увеличение содержания пигмента. Что же касается аллолинии Роланд (W8), то снижение количества хлорофилла «а» по отношению к дикой форме W8 сочеталось с его увеличением по сравнению с сортом Роланд. Интересно при этом, что сорт Роланд характеризовался

большим содержанием указанного пигмента, чем сорт Вежа, а сорт Визит и линия W8, практически не отличаясь между собой, превосходили по этому показателю сорт Роланд (данные не показаны). Таким образом, именно объединение ядра и цитоплазмы наиболее «благополучных» по содержанию хлорофилла «а» родителей (сорта Визит и линии W8) привело к неожиданно резкому снижению этого показателя у аллоплазматической линии.

Определённый интерес представляет сопоставление полученных данных с результатами проведённых ранее исследований, в которых было показано воздействие генетических факторов митохондрий и хлоропластов на формирование признаков продуктивности растений [6]. Так, например, перевод ядерного генома сорта Роланд на цитоплазму W8 приводил к увеличению высоты растения и массы семян с растения по сравнению с исходным сортом Роланд. Воздействие генетических факторов цитоплазмы линии W4 также выражалось в увеличении высоты растения у аллолинии Роланд (W4), но снижало этот же показатель у аллолинии Вежа (W4), по сравнению с исходными сортами.

При изучении аллолиний с ядром сорта Роланд получены также данные, свидетельствующие об изменении частот рекомбинации и расщепления по ядерным локусам под воздействием той или иной цитоплазмы [7].

Результаты, свидетельствующие о важности сбалансированности ядерного и цитоплазматического геномов для формирования признаков продуктивности и устойчивости к патогенам, получены также и для других культур, например при изучении аллоплазматических линий пшеницы [19, 20].

Полученные результаты указывают на неоднозначную связь между функциональной активностью хлоропластов, общей жизнеспособностью растения, его продуктивностью и сбалансированностью ядерного и органельных геномов и свидетельствуют о необходимости комплексного анализа продуктивно-



Рис. 2. Кинетика фотохимического тушения флуоресценции (qP) в листьях ячменя дикой формы W8 и аллолинии Роланд (W8).



продуктивности растений при ведении гибридной селекции. Факты улучшения тех или иных физиологических параметров и показателей продуктивности у замещённых линий при сравнении с исходными родительскими формами (в том числе с возделываемыми сортами) говорят о возможности и необходимости вовлечения в селекционный процесс новых источников комбинативной изменчивости.

Литература

1. Даниленко Н.Г.. Мир геномов органелл / Н.Г. Даниленко О.Г. Давыденко. — Минск: Тэхналогія, 2003. — С. 494.
2. Сэджер Р. Цитоплазматические гены и органеллы. — М.: Мир. — 1975. — С. 423.
3. Давыденко О.Г. Отклонения в расщеплении по признаку мужская стерильность, вызванные влиянием цитоплазмы // Цитология и генетика. — 1984б. — Т. 18. — С. 218–222.
4. Орлов П.А. Взаимодействие ядерных и цитоплазматических генов в детерминации развития растений. — Минск, 2001. — С. 170.
5. Evans J.R. The relationship between carbon dioxide limited photosynthetic rate and Rubisco content in two nuclear-cytoplasmic substitution lines of wheat, and the coordination of ribulose biphosphate-carboxylation and electron transport capacities / Evans J.R // Planta. — 1986. — Vol. 167. — P. 351–358.
6. Goloenko I.M. Productivity characteristics of substituted barley lines collection with marked chloroplast and mitochondrial genomes / Goloenko I.M. et al. // Cellular & Molecular Biology Letters. — 2002. — Vol. 7. — № 2A. — P. 483–491.
7. А.М. Шимкевич, Н.В. Луханина, И.М. Голоенко, О.Г. Давыденко. Анализ частот расщепления по морфологическим и SSR-локусам в гибридных комбинациях замещённых линий ячменя / А.М. Шимкевич, Н.В. Луханина, И.М. Голоенко, О.Г. Давыденко. // Генетика. — 2007. — № 1 (в печати).
8. Schreiber U. Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer / Schreiber U // Photosynthesis Res. — 1986. — Vol.9. — P. 261–272.
9. Rohacek K. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications / Rohacek K., Bartak M. // Photosynthetica — 1999. Vol. 37. — №№ 3. — P.339–363.
10. Lichtenthaler H.K. Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology / Lichtenthaler H.K. et al. // Radiat. Environ. Biophys. — 1986. — Vol.25. — P.297–308.
11. Шлык А.А. Определение хлорофилла и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев // Биохимические методы в физиологии растений. — М.: Наука. — 1971.— С.154–170.
12. Рубин А.Б. Механизмы регуляции первичных процессов фотосинтеза// V Годлевские чтения. — Минск, 1999. — С.5–25.
13. Lichtenthaler H. Measurement of chlorophyll fluorescence kinetics (Kautsky effect) and the chlorophyll fluorescence decrease ratio (R_{fd} -values) with the PAM-fluorometer / Lichtenthaler H., Buschmann C., Knapp M. // In.: "Analytical Methods in Plant Stress Biology" (Ed. M. Filek, J. Biesaga-Koscielniak, I. Marcinska). — Krakow, 2004. — P. 93–111.
14. Krause G.H. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics / Krause G.H., Weis E. // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1991. — Vol. 42. — P. 313–349.
15. Klinovsky T. Sensitivity of the relative Fpl level to the heat stress / Klinovsky T., Naus J // Photosynth. Res. — 1994. — Vol.39. — №№ 2. — P.201–204.
16. Yordanov I. Influence of drought, high temperature, and carbamide cytokinin 4-PU-30 on photosynthetic activity of bean plants. 1. Changes in chlorophyll fluorescence quenching / Yordanov I., Velikova V., Tsonev T. // Photosynthetica. — 1999. — Vol.37. — N3. — P.447–457.
17. Lu C.M. Acute toxicity of excess mercury on the photosynthetic performance of cyanobacterium *S. platensis* – assessment by chlorophyll fluorescence analysis / Lu C.M., Chan C.W., Zhang J.H. // Chemosphere/ — 2000. — Vol.41. — №№ 1–2. — P.191–196.
18. Maxwell K. Chlorophyll fluorescence - a practical guide / Maxwell K., Johnson G. N // J. of Exp. Botany. — 2000. — Vol.51. — P.659–668.
19. Палилова А.Н. Влияние плазмена на признаки, определяющие продуктивность аллоплазматических линий пшеницы // Цитология и генетика. — 1986. — Т. 20. — № 3. — С. 224–229.
20. Волуевич Е.А. Влияние чужеродного плазмена растения-хозяина на устойчивость мягкой пшеницы к возбудителю твёрдой головни / Волуевич Е.А., Булойчик А.А // Цитология и генетика. — 1999. — Т. 33. — № 4. — С. 43–48.

Functional state of photosynthetic system in barley alloplasmic lines

A.M. Shymkevich¹, V.N. Makarov², I.M. Goloenko¹, O.G. Davydenko¹

Institute of Genetics and Cytology of National Academy of Sciences of Belarus

Institute of biophysics and cellular engineering of National Academy of Sciences of Belarus

◆ SUMMARY: The peculiarities of photosynthetic system functioning in barley alloplasmic lines were investigated by PAM fluorimetry. The substitution of nuclear genome was shown to affect differently several photosynthetic parameters. The importance of the balance between nuclear and organelle barley genetic systems for the photosystem II functioning was demonstrated.

◆ KEY WORDS: аллоплазматическая линия — alloplasmic lines, органельный геном — organelle genome, РАМ-флуориметрия — PAM fluorimetry, флуоресценция хлорофилла — fluorescence of chlorophyll, фотосинтетический аппарат — photosynthetic system, фотосистема II — photosystem II, ячмень — barley