

БИОЛОГИЯ

УДК 581.132 + 577.3 + 581.19

Академик В. Н. РЕШЕТНИКОВ¹, В. Л. КАЛЕР¹, О. П. БУЛКО¹, П. Д. УСМАНОВ²,
О. В. УСМАНОВА²СООТНОШЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КОДИРУЕМЫХ В ГЕНОМАХ ЯДРА
И ХЛОРОПЛАСТА НАТИВНЫХ ФОРМ ХЛОРОФИЛЛА
В ЛИСТЯХ ПИГМЕНТНЫХ МУТАНТОВ *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH¹Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск,²Институт физиологии растений и генетики АН Республики Таджикистан, Душанбе

Поступило 05.03.2007

Введение. Соподчинение геномов ядра и хлоропластов в клетках высших растений остается актуальной исследовательской проблемой. Белки комплексов реакционных центров обеих фотосистем (КРЦ 1 и КРЦ 2) и их антенных структур кодируются и синтезируются в хлоропласте, тогда как белки светособирающих комплексов (ССК) кодируются в ядре и синтезируются в цитоплазме [1]. Все пигмент белковые комплексы локализованы в хлоропласте и кооперативно функционируют под общим управлением ядра.

Мы сравнили нативные спектральные формы хлорофилла (НСФ) у двух генетически чистых контрастных по окраске листьев мутантов и исходной расы *Arabidopsis thaliana*. Мутации генов, кодирующих белки различных НСФ могут влиять на емкость по хлорофиллу (Хл) отдельных белков этих комплексов. В этом случае неизбежно перераспределение потока поглощенной листом световой энергии между фотосистемами, что не может не повлиять на эффективность первичных фотохимических реакций фотосинтеза и, как следствие, на фотосинтетическую продуктивность.

Объекты и методы. Исследовали генетически чистые ядерные Хл-мутанты и их исходную форму из генетической коллекции семян арабидопсиса, созданной в лаборатории физиологической генетики Института физиологии растений и генетики АН Республики Таджикистан. Краткая характеристика объектов: мутант *F6 chl* – желто-зеленая окраска листьев и растения, переходящая в светло-желтую и светло-зеленую, в зависимости от условий выращивания, развитие и семенная продуктивность понижены; мутант *B6 130* – светло-зеленая окраска листьев и растения, развитие и продуктивность нормальные; исходная форма – раса *Columbia (Col)*, имеющая нормальную зеленую окраску (контроль). Для исследования мы применили нетрудоемкий способ разложения спектра поглощения живых листьев, регистрируемого при комнатной температуре. Спектр, рассматриваемый как суперпозиция гаусовых кривых поглощения НСФ, разложили на составляющие способом, разработанным в МГУ им. М. В. Ломоносова под руководством Ф. Ф. Литвина [2]. Это позволяет оценить содержание Хл в каждой из девяти универсальных НСФ и долю поглощаемой ею световой энергии.

Растения выращивали в сосудах (0,5 л) с грунтовой почвой в люминостае с люминесцентными лампами белого света при интенсивности освещения 10 тыс. люкс и длине светового периода 16 ч в сутки. Температуру поддерживали 18–22°C. После 22 суток выращивания розеточные листья срезали и снимали спектр поглощения на модифицированном нами регистрирующем спектрофотометре СФ 14 (ЛОМО) с интегрирующей сферой.

Цитометрическое определение размера клеток, их числа на единице поверхности листьев и числа хлоропластов в клетке проводили на мацерированных листьях по оригинальной методике [3]. Измерения проводили в камере Фукса — Розенталя. Из части листьев экстрагировали пигменты 96%-ным этанолом и определяли содержание Хл А и Хл В по формулам [4]. Распреде-

ние Хл в системе НСФ рассчитывали, используя обратную матрицу коэффициентов [5] и свою программу, написанную в интегрированной среде Turbo Pascal 6.0. Все измерения проводили с 10-кратной повторностью. Для обработки результатов использовали пакеты Statistica 6.0. и Statgraphics Plus.

Результаты и их обсуждение. Содержание Хл в листе исходной формы (*Col*) арабидопсиса оказалось наибольшим (табл. 1). Оба мутанта (*F6 chl* и *B6 130*) содержали как Хл А, так и Хл В меньше, чем *Col*, но в разных соотношениях, выражающихся в изменении отношения А/В.

Таблица 1. Содержание хлорофиллов А и В (мг / г св. веса) и их соотношение в листьях растений

Объект	Хлорофилл А	Хлорофилл В	Сумма А+В	Отношение А/В
<i>Col</i>	0,810 (1,00)	0,334 (1,00)	1,144 (1,00)	2,43 (1,00)
<i>F6 chl</i>	0,125 (0,15)	0,092 (0,28)	0,217 (0,19)	1,36 (0,56)
<i>B6 130</i>	0,567 (0,70)	0,175 (0,52)	0,742 (0,65)	3,25(1,34)

Примечание. Все различия достоверны при $p < 0,001$. В скобках показан результат нормирования по исходной форме.

Таблица 2. Количество хлоропластов в клетке и их поверхностная плотность в листьях изучавшихся форм растений арабидопсиса

Объект	Число клеток на кв. мм листа	Число хлоропластов	
		в клетке	на кв. мм листа
<i>Col</i>	1025 ± 8,8	45,7 ± 0,7	46900 ± 980
<i>F6 chl</i>	933 ± 5,9	37,9 ± 1,4	35400 ± 2400
<i>B6 130</i>	937 ± 12,4	37,1 ± 1,2	34800 ± 1300

Примечание. Приведены значения ошибки среднего ($p = 0,05$; $n = 10$).

Содержание Хл и отношение А/В у исходной формы *Col* и мутанта *B6 130* близки к нормальному, тогда как у мутанта *F6 chl* они существенно понижены. У мутанта *F6 chl* содержание Хл В снижается значительно меньше, чем убывает Хл А, но уменьшение содержания обоих пигментов больше, чем у *B6 130*. Превышение отношения А/В над исходной формой у мутанта *B6 130* можно объяснить несколько большим снижением содержания Хл В, чем Хл А у этого мутанта.

Анализ некоторых параметров мезоструктуры листьев (табл. 2) показал, что размер клетки листьев у обоих мутантов примерно одинаков, но у исходной формы клетки значительно крупнее. Число хлоропластов в клетке и число клеток на единицу поверхности листьев у обоих мутантов также одинаковы, а у исходной формы *Col* — существенно больше. Следовательно, малое содержание Хл у мутанта *F6 chl* в расчете на свежий вес (табл.1) можно объяснить меньшим содержанием его в хлоропласте, а не пониженным числом пластиид в листьях этой формы. Нормальная зеленая окраска исходной формы и меньшая насыщенность зеленого цвета у мутантов может быть частично объяснена различиями в поверхностной плотности хлоропластов.

Универсальные НСФ листьев (рис. 1) принято обозначать через положение главного максимума их оптической плотности

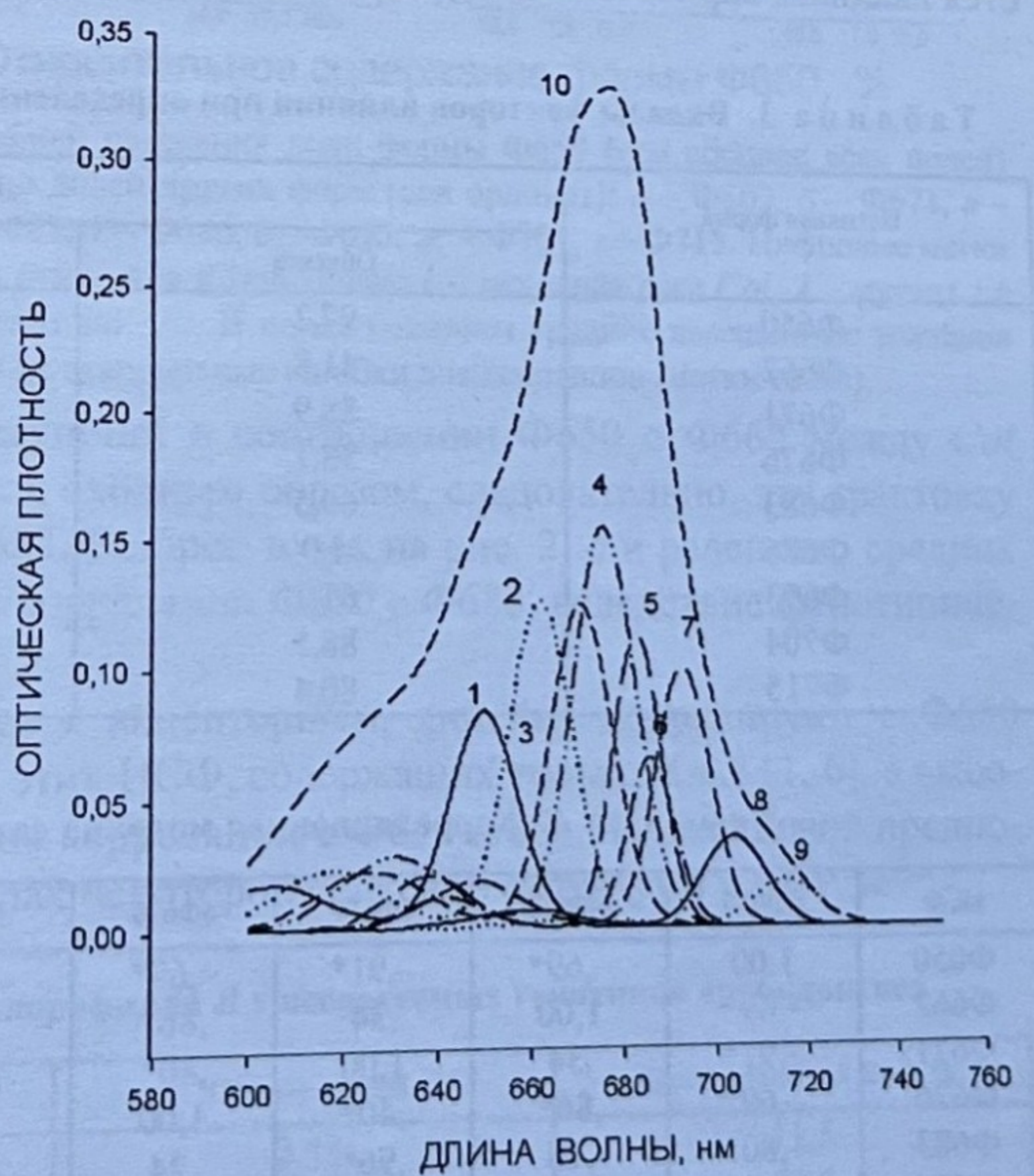


Рис. 1. Декомпозиция спектра поглощения нативного листа мутанта *F6 chl* арабидопсиса. Площади, ограниченные пронумерованными кривыми, соответствуют доле хлорофилла в отдельной форме: 1 — Ф650, 2 — Ф662, 3 — Ф671, 4 — Ф676, 5 — Ф683, 6 — Ф686, 7 — Ф693, 8 — Ф704, 9 — Ф715. 10 — сумма площадей составляющих

на шкале длин волн (нм). Функциональная нагрузка НСФ распределена следующим образом [1, 6]. Самая коротковолновая – форма Ф650 (1) отражает содержание Хл В, который полностью входит в состав ССК. К этому комплексу относят и три донорные формы Хл А: формы Ф662 (2), Ф671 (3), Ф676 (4), в формировании которых участвуют и молекулы Хл В. Формы Ф683 (5), Ф686 (6) и Ф693 (7) содержат только Хл А и выполняют донорно-акцепторную функцию. Акцепторные формы Ф704 (8) и Ф715 (9) содержат только Хл А.

Силу влияния факторов эксперимента на его результат оценивали методом дисперсионного анализа (табл. 3). Для каждой НСФ оценивали вклады генотипа растения (объект), различий между отдельными растениями каждого генотипа (образец) и вклад аналитической погрешности в общую дисперсию результата. Из табл. 3 видно, что обусловленная мутациями дисперсия изучаемого распределения Хл по НСФ лучше проявляется по формам Ф650, Ф671, Ф704 и Ф715. Несколько менее ценна информация, получаемая от форм Ф683 и Ф693. Для форм Ф662, Ф676 и, особенно, Ф686 характерна сильная вариабельность признака между образцами одного объекта, что можно, по-видимому, объяснить фенотипической изменчивостью.

Коррелятивные связи между долями Хл в тех НСФ, изменчивость которых определяется генотипом растения, приведены в табл. 4. Оказалось, что коэффициенты корреляции между Хл В (Ф650) и акцепторными формами Хл А (Ф693, Ф704 и Ф715) *положительны* и связь между этими формами близка к линейной, а связь Хл В с донорными формами (Ф662, Ф671 и Ф676) и с одной из донорно-акцепторных форм (Ф683) *отрицательна* и тоже близка к линейной.

Сопоставляя данные табл. 3 и 4, можно заключить, что акцепторные НСФ Ф704 и Ф715, входящие КРЦ 1, у растений арабидопсиса тесно связаны с ССК, содержащим Ф650. Донорная Ф671, по-видимому, не входит в этот комплекс и вместе с Ф683 содержится в КРЦ 2 и осуществляет донорную и донорно-акцепторную функции. Ф686 значимо и положительно связана с донорными формами Ф662 и Ф676, но отрицательно – с акцепторной Ф693. Можно полагать, что Ф662, Ф671 и Ф676 находятся в ССК фотосистемы 2. Эти результаты согласуются с выводами [1, 6]. О форме Ф686, однако, можно говорить лишь предположительно, поскольку она отличается высокой вариабельностью между образцами растений одного генотипа.

Таблица 3. Вклады факторов влияния при определении доли хлорофилла в каждой из нативных форм

Нативная форма	Вклады факторов влияния, %		
	Объекта	Образца	Погрешности
Ф650	97,2	2,8	0,0
Ф662	41,8	58,2	0,0
Ф671	88,9	11,1	0,0
Ф676	38,1	61,9	0,0
Ф683	69,5	30,5	0,0
Ф686	4,0	94,0	2,0
Ф693	61,1	38,9	0,0
Ф704	88,5	11,5	0,0
Ф715	80,4	19,6	0,0

Таблица 4. Корреляционная матрица долей хлорофилла спектральных форм

НСФ	6Ф650	6Ф662	6Ф671	6Ф676	6Ф683	6Ф686	6Ф693	7Ф704	7Ф715
Ф650	1,00	-,69*	-,91*	-,69*	-,80*	-,19	,54*	,96*	,92*
Ф662	-,69*	1,00	,34	,86*	,18	,64*	-,44*	-,65*	-,64*
Ф671	-,91*	,34	1,00	,40*	,96*	-,13	-,46*	-,89*	-,84*
Ф676	-,69*	,86*	,40*	1,00	,24	,74	-,77*	-,72*	-,79*
Ф683	-,80*	,18	,96*	,24	1,00	-,36	-,36*	-,82*	-,73*
Ф686	-,19	,64*	-,13	,74*	-,36	1,00	-,59*	-,17	-,31
Ф693	,54*	-,44	-,46*	-,77*	-,36*	-,59*	1,00	,64*	,75*
Ф704	,96*	-,65*	-,89*	-,72*	-,82*	-,17	,64*	1,00	,92*
Ф715	,92*	-,64*	-,84*	-,79*	-,73*	-,31	,75*	,92*	1,00

* Коэффициенты, значимые при $p < 0,05$.

Рис. 2 дает наглядное представление о деталях первой строки табл. 4, которые не удается обнаружить при рассмотрении коэффициентов корреляции. В каждой части рис. 2 приведены название НСФ, разброс экспериментальных точек и средние взвешенные значения со стандартными ошибками долей НСФ у разных генотипов. Необъясненная дисперсия оказалась малой (критерий Уилкса = 0,00387). Для всех НСФ характерна групповая локализация экспериментальных точек. На рис. 2 метки 2 расположены в области малых значений, метки 1 и 3 – более высоких значений доли Ф650. Такая сегрегация отражает особенности мутанта *F6 chl*, отсутствующие у мутанта *B6 130* и у исходной расы. Поскольку Ф650 содержит Хл В, формирующийся на субъединицах, кодируемых в ядре [1], сегрегацию можно рассматривать как характерный признак экспрессии генов, контролирующих пигментную систему хлоропластов.

Экспериментальные точки для Ф662 (рис. 2, а) с меткой 2 располагаются в верхней части рисунка слева. Значит у мутанта *F6 chl* малая доля Ф650 связана с высокой долей Ф662. Точки с меткой 1 и 3 располагаются в общей группе. Это можно трактовать как отсутствие различий в соотношении Ф650 с Ф662 между *Col* и *B6 130*. Метки на рис. 2, а – г располагаются, сходным образом, следовательно, эту трактовку можно распространить и на Ф671, Ф676 и Ф683. Разброс точек на рис. 2, д и равенство средних для трех генотипов подтверждают отсутствие корреляции Ф650 с Ф686, вследствие фенотипической лабильности Ф686.

Формы Ф693, Ф704 и Ф715, относящиеся к акцепторным, линейно коррелируют с Ф650 (табл. 4). Сегрегация меток сохраняется и для этих НСФ, содержащих только Хл А [1, 6], а высокие и положительные значения коэффициентов корреляции с Ф650 (табл. 4) позволяют предполагать их пространственную близость в пределах некоторой белковой структуры в КСР 1.

Таблица 5. Оценка доли дополнительного хлорофилла В у исследуемых генотипов арабидопсиса

Генотип	Доля Ф650, %	Отношение А/В	Дополнительный Хл В, %
<i>Col</i>	17,7	2,43	11,5
<i>F6 chl</i>	11,9	1,36	30,5
<i>B6 130</i>	17,2	3,25	6,3

В табл. 5 представлены средние значения доли Ф650 у *Col*, *F6 chl* и *B6 130*, исправленные на дисперсию, вносимую влиянием фенотипа. Сопоставив эти данные с табл. 1 можно обнаружить,

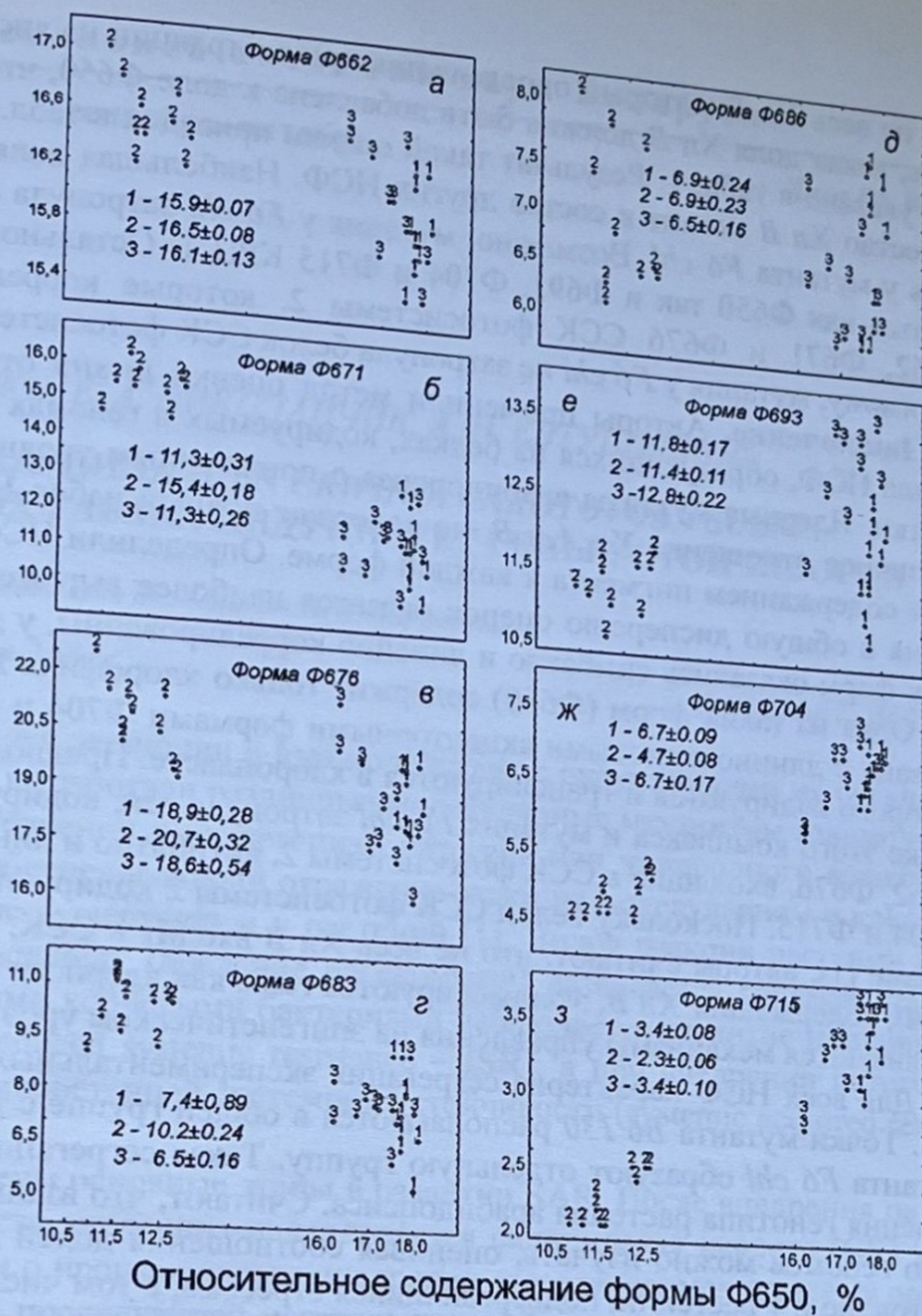


Рис. 2. Графики рассеяния доли формы Ф650 (оси абсцисс всех полей) относительно долей других форм (оси ординат): а – Ф662, б – Ф671, в – Ф676, г – Ф683, д – Ф686, е – Ф693, ж – Ф704, з – Ф715. Цифровые метки возле точек относятся к генотипам: 1 – исходная раса *Col*, 2 – мутант *F6 chl*, 3 – мутант *B6 130*. В полях показаны средние взвешенные значения и их стандартные ошибки для генотипов (метки те же)

что не весь Хл В, который определяется при экстракции из листа, входит в Ф650. Легко вычислить, какая доля Хл В должна быть добавлена к доле Ф650, чтобы отношение А/В стало таким, как указано в табл. 1. Результат такой оценки приведен в табл. 5. Следовательно, некоторое количество Хл В входит в состав других НСФ. Наибольшая доля «дополнительного» Хл В оказалась у мутанта *F6 chl*. Возможно, мутация у *F6 chl* затронула субъединицу, на которой формируются как Ф650 так и Ф693, Ф704 и Ф715 КРЦ 1. Остальной Хл В входит в донорные НСФ Ф662, Ф671 и Ф676 ССК фотосистемы 2, которые коррелируют с Ф650 антибатно. По-видимому, мутация у *F6 chl* не затронула белок ССК фотосистемы 2.

Заключение. Авторы применили метод оценки *in situ* относительного содержания хлорофилла НСФ, образующихся на белках, кодируемых в геномах ядра и хлоропласта растительной клетки. Ядерные мутанты арабидопсиса с пониженным уровнем содержания пигментов имеют различное отношение Хл А и В, но содержат полный набор НСФ, различающихся относительным содержанием пигмента в каждой форме. Определили НСФ, у которых вклад генотипа растения в общую дисперсию оценок оказался наиболее выраженным. Доли пигмента у одних из этих форм оказались симбатно и линейно коррелированы, у других – антибатно и тоже линейно. Одна из таких форм (Ф650) содержит только хлорофилл В. Эта форма симбатно и линейно связана с длинноволновыми акцепторными формами Ф704 и Ф715, входящими в КРЦ 1, белки которого кодируются и транслируются в хлоропласте. Предположили, что Ф650 локализована на белке этого комплекса и мутация *F6 chl* затронула ген, кодирующий данный белок. НСФ Ф671, Ф662, Ф676, входящие в ССК фотосистемы 2, антибатно и линейно коррелирует с формой Ф650, Ф704 и Ф715. Поскольку белки ССК фотосистемы 2 кодируются в ядре и синтезируются в цитоплазме [1], авторы считают, что не весь Хл В входит в ССК, что при управлении образованием НСФ, содержащих Хл В, экспрессируются гены как ядерного так и хлоропластного генома, либо реализуются механизмы управления на эпигенетическом уровне.

Для всех НСФ характерна сегрегация экспериментальных точек на корреляционных графиках. Точки мутанта *B6 130* располагаются в общей группе с точками исходной расы *Col*. Точки мутанта *F6 chl* образуют отдельную группу. Такая сегрегация рассматривается как признак изменения генотипа растения арабидопсиса. Считают, что взаимодействие ядерного и хлоропластного геномов можно изучать, оценивая соотношения долей НСФ, не только у пигментных мутантов, но и у растений, подвергающихся стрессам, в том числе и экспериментальным.

Литература

1. Орт В. Р., Говинджи. Фотосинтез / Под ред. Говинджи. Т. 1.. М., 1987. С. 8–89.
2. Литвин Ф. Ф., Беляева О. Б., Гуляев Б. А., Карнеева Н. В., Синещеков В. А., Стадничук И. Н., Шубин В. В. // Хлорофилл. Мн. 1974. С. 215–231.
3. Вечер А. С., Булко О. П. // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1985. № 3. С. 104–105.
4. Wintermans J. F. G. M., De Mots A. // Biochimica et Biophysica Acta. 1965. 109. P. 448–453.
5. Гуляев Б. А., Венедиктов Е. П., Карнеева Н. В., Литвин Ф. Ф. // Научные доклады высшей школы. Биологические науки. 1973. № 10. С. 48–56.
6. Литвин Ф. Ф., Синещеков В. А. // Биофизика. 1967. Т. 12, № 3. С. 433–444.

RESHETNIKOV V. N., KALER V. L., BULKO O. P., USMANOV P. D., USMANOVA O. V.

biolog@it.org.by

RATIO OF ENCODED IN NUCLEAR AND CHLOROPLAST GENOMES CHLOROPHYLL NATIVE FORMS IN LEAVES OF *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH PIGMENT MUTANTS

Summary

Chlorophyll shares in each of its nine native spectral forms in leaves of two chlorophyll mutants and their initial race of arabidopsis plants were evaluated. Native forms with substantial differences in shares among the genotypes were revealed. The donor form containing only chlorophyll B was shown to link positive by and linear by with plastome encoded acceptor-forms of photosystem 1 complex containing only chlorophyll A. These forms correlate negatively with donor and donor-acceptor forms of photosystem 2 light-harvesting complex containing both chlorophyll A and B. The ratio of chlorophyll shares of individual forms is conditioned by the conformation of their protein carriers encoded in genomes of different cell organelles, that is why, the determination of the native chlorophyll forms correlations makes it possible to study genome-plastome interaction.