

УДК: 581.132.144

**ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧНА ЗУМОВЛЕНІСТЬ СВІТЛОВИХ РЕАКЦІЙ ХЛОРОПЛАСТІВ
ГЕТЕРОЗИСНИХ ГІБРИДІВ КУКУРУДЗИ
Ю.Г.Масікевич**

Чернівецький факультет Національного технічного університету (Чернівці, Україна)

Досліджено вплив інгібіторів білкового синтезу – лінкоміцину та циклогексиміду на прояв фотофізичних та фотохімічних реакцій фотосинтезу у гетерозисних гібридів кукурудзи та їх вихідних форм. Показано, що гібридизація на гетерозис супроводжується підвищенням автономії хлоропластів стосовно основних фотоенергетичних процесів: переносу електронів по електронтранспортному ланцюгу (ЕТЛ) та фотофосфорилування.

Ключові слова: *гетерозис, фотосинтетичний апарат, реакція Хілла, фотофосфорилування, флуоресценція, інгібіторна техніка.*

Вступ

Слід зазначити, що існуючі на сьогоднішній день теоретичні обґрунтування «гібридної сили» (East, 1936; Jones, 1957; Турбин, 1961; Струнников, Струнникова, 2003), незважаючи на їх важливість та значимість, не можуть в повному обсягу пояснити природу феномену гетерозису в рослин. Кожний з розглянутих теоретичних підходів при вивченні природи гетерозису обов'язково включає необхідність вивчення цитоплазматичних генетичних факторів. Так, в одному випадку така необхідність пояснюється можливістю комплементатії різних генетичних систем, в другому – підтриманням певного генетичного балансу в клітині, в третьому – надлишком генетичної інформації, необхідної для формування та функціонування фотосинтетичного апарату. На даний час існує достатня кількість фактів, які відводять значну роль в виникненні гетерозису клітинним органелам та також ядерно-цитоплазматичним взаємодіям (Srivastava, 1981; Яковлев, 1971). Ряд авторів (Костышин, Масікевич, 1984; Овчинникова, 1976) значну роль в забезпеченні механізму гетерозису відводять хлоропластам. Завдяки їх дослідженням в науці стверджується термін "хлоропластний" гетерозис. Особлива роль при цьому відводиться світловим – фотоенергетичним реакціям фотосинтезу (Биоэнергетические ..., 1991).

Оскільки позаядерні генетичні системи є більш буферними, в порівнянні з ядерними, і можуть змінюватися впродовж життєвого циклу, то саме їм, на наш погляд, може належати виключно важлива роль в забезпеченні дискретності прояву гетерозису зокрема за фотосинтетичними ознаками. Саме тому актуальним та необхідним є вивчення комплементатії ядерної та хлоропластної генетичних систем в процесі створення функціонально активного фотосинтетичного апарату у високогетерозисних гібридних організмів.

Матеріали та методи досліджень

Об'єктами дослідження служили проростки прямих та реципрокних гібридів кукурудзи, а також їх вихідних форм у фазі появи другого листка, що відрізнялися за продуктивністю фотосинтезу.

Вимір швидкості реакції Хілла проводили спектрофотометрично при 420 нм (Гавриленко та ін., 1975) по кількості відновленого фериціаніду калію. Реакційна суміш вміщувала: 4 мл суспензії хлоропластів (еквівалентне 50–100 мкг хлорофілу) та 1 мл водного розчину, що містив 2 мкмоля фериціаніду калію. Концентрацію хлорофілу в суспензії визначали методом Arnona (Arnon, 1954). Виділення хлоропластів проводили за методом Негтманн (Негтманн, 1982). Швидкість фотофосфорилування визначали люмінісцентним методом по кількості АТФ, що утворюється за допомогою автоматизованої системи дослідження хемілюмінесценції («Люцифер-0,2М») і біолюмінісцентного АТФ-реагенту на основі розчинної люциферази світлячків (Ладыгина, Рубин, 1971).

Змінну і повільну флуоресценції визначали за методом, запропонованим Закирьяновим і співавторами (Закирьянов та ін., 1992). Використана експрес-методика дає можливість визначення швидкості відновлення первинних акцепторів електронів в електронтранспортному ланцюзі фотосистеми II (ЕТЛ ФС II) і часу запуску темнових реакцій циклу Кальвіна шляхом визначення співвідношення змінної і фонові флуоресценції (F_v/F_o), а також часу напівзатухання флуоресценції ($T_{1/2}$).

В якості інгібіторів білкового синтезу використовували лінкоміцин – 500 мкг/мл (ЛКМ, Мосмедпрепарат), блокуючий пептидилтрансферазну реакцію на стадії елонгації в хлоропластних 70S

рибосомах, та циклогексимід (ЦГІ, Serva) – 100 мкг/мл, інгібітор транслокази на 80S рибосомах цитоплазми (Дудник, Вахидова, Гиллер, 1990).

Результати дослідів опрацьовані статистично (Маслов, 1978).

Результати та обговорення

Раніше нами було показано (Костышин, Масікевич, 1984), що гібридизація кукурудзи на гетерозис супроводжується посиленням функціональної активності фотосинтетичного апарату, особливо це проявляється в швидкості переносу електронів по ЕТЛ (реакція Хілла), а також інтенсивності нециклічного фотофосфорилування (Биоэнергетические ..., 1991), що забезпечується, в основному, функціонуванням ФС II. Використання інгібіторів білкового синтезу (ЦГІ, ЛКМ) дало можливість встановити (табл. 1–2), що подібне підвищення функціональної активності зазначених процесів відбувається в основному за рахунок зростання ролі власної (70S) білоксинтезуючої системи пластид. Так, у гомозиготних ліній, вихідних форм простого міжлінійного гібриду, фотохімічна активність хлоропластів забезпечується в основному функціонуванням цитоплазматичної (80S) білоксинтезуючої системи і в незначній мірі (25–27 %) залежить від білоксинтезуючої системи пластид. З іншої сторони, для високопродуктивних простих та подвійних гетерозисних гібридів характерним є підвищення автономії 70S – білоксинтезуючої системи щодо забезпечення підвищеної активності реакції Хілла (табл. 1).

Таблиця 1.

Вплив інгібіторів білкового синтезу на активність реакції Хілла (мкмоль відновленого $K_3Fe(CN)_6$ /мг хлорофілу/год.) гетерозисних гібридів кукурудзи та їх вихідних форм

Варіанти дослідів	л. ВІР 44 (♀)	г. Слава (F ₁)	л. ВІР 38 (♂)	г. Слава (♀)	г. ВІР 42 (F ₁)	г. Світоч (♂)
Контроль (%)	118,6 ± 7,8 100%	170,4 ± 5,2 100%	101,8 ± 3,2 100%	170,4 ± 5,2 100%	145,4 ± 3,6 100 %	130,6 ± 4,2 100%
ЛКМ (500 мкг/мл)	88,5 ± 2,1 74,6%	84,5 ± 3,6 49,6%	74,6 ± 2,9 73,3%	84,5 ± 3,6 49,6%	73,9 ± 2,4 50,8%	70,0 ± 1,6 53,6%
% інгібування	25,4%	50,4%	26,7%	50,4%	49,2%	46,4%
ЦГІ (100 мкг/мл)	46,6 ± 2,0 39,3%	90,8 ± 4,3 53,3%	35,8 ± 2,4 35,2%	90,8 ± 4,3 53,3%	70,1 ± 1,9 48,2%	58,6 ± 2,7 44,9%
% інгібування	60,7%	46,7%	64,8%	46,7%	51,8%	55,1%

Отримані результати (табл. 2) свідчать також, що батьківські форми гібридів відрізняються за чутливістю до одних і тих же інгібіторів білкового синтезу по циклічному та нециклічному фотофосфорилуванню. Так, якщо одна із батьківських форм проявляє максимальну чутливість по циклічному фотофосфорилуванню і меншу по нециклічному до лінкоміцину, то друга – характеризується більш низькою чутливістю до даного інгібітора по обох типах фотофосфорилування. По відношенню до циклогексиміду виявлена аналогічна специфіка чутливості циклічного і нециклічного фотофосфорилування вихідних батьківських форм досліджуваних нами гібридів (табл. 2). Отримані результати дають право стверджувати, що зростання рівня нециклічного фотофосфорилування у гібридів зумовлено в першу чергу змінами в інтенсивності синтезу білків хлоропластного кодування.

Використовуючи дані аналізу індукційних кривих флуоресценції, вдалося показати, що вихідні форми гетерозисних гібридів відрізняються між собою за величиною співвідношення змінної до фоновій флуоресценції (F_v/F_o). Для гібридних організмів характерним є досить високе значення даного співвідношення в порівнянні з гомозиготними лініями. Оскільки величина співвідношення змінної і фоновій складових флуоресценції визначає активність саме первинних світлових реакцій фотосинтезу (Закирьянов та ін., 1992), то це дає підставу стверджувати, що для гібридних організмів характерна висока швидкість перебігу як фотохімічного (табл. 1), так і фотофізичного етапів фотосинтезу (табл. 3), в основі якої лежить посилення активності власної (лінкоміцин-залежної) білоксинтезуючої системи пластид. В той же час дані табл. 3 свідчать також про те, що вихідні форми доповнюють одна одну і, по швидкості запуску темнових реакцій фотосинтезу, достовірно домінують над гібридами першого покоління. Використання інгібіторів білкового синтезу дало можливість встановити, що швидкість запуску темнових реакцій фотосинтезу у гібридів більше залежна від трансляції на 80S рибосомах (табл. 3).

Таблиця 2.

Вплив інгібіторів білкового синтезу на активність* циклічного (ЦФФ) та нециклічного фотофосфорилювання (НЦФФ) гетерозисних гібридів кукурудзи та їх вихідних форм (M±m)

Варіанти дослідів	л. ВІР 44 (♀)		г. Слава (F ₁)		л. ВІР 38 (♂)		г. Слава (♀)		г. ВІР 42 (F ₁)		г. Світоч (♂)	
	ЦФФ	НЦФФ	ЦФФ	НЦФФ	ЦФФ	НЦФФ	ЦФФ	НЦФФ	ЦФФ	НЦФФ	ЦФФ	НЦФФ
Контроль (%)	225,6 ±0,46	282,9 ±0,90	146,2 ±1,50	410,8 ±2,00	120,4 ±2,20	80,5 ±1,60	146,2 ±1,50	410,8 ±2,00	130,5 ±2,40	405,2 ±0,85	112,4 ±0,50	360,8 ±1,50
ЛКМ (500 мкг/мл)	125,2 ±0,55	267,3 ±0,85	63,2 ±1,20	336,9 ±1,85	102,3 ±0,62	35,7 ±0,56	63,2 ±1,20	336,9 ±1,85	54,2 ±0,35	322,1 ±1,10	61,6 ±0,36	309,2 ±1,75
% інгібування	44,5	5,5	56,8	18,0	15,0	45,6	56,8	18,0	58,5	20,5	55,2	16,3
ЦГІ (100 мкг/мл)	167,8 ±1,60	148,8 ±1,35	73,8 ±1,05	287,6 ±1,44	62,1 ±0,48	72,4 ±0,90	73,8 ±1,05	287,6 ±1,44	64,9 ±0,82	290,9 ±2,15	54,2 ±0,40	243,5 ±1,22
% інгібування	25,6	47,4	49,5	30,0	48,4	10,1	49,5	30,0	50,3	28,2	51,8	32,5

* - мкм Р / мехл. за год

Таблиця 3.

Вплив інгібіторів білкового синтезу на параметри індукційних кривих флуоресценції гетерозисних гібридів кукурудзи та їх вихідних форм

Варіанти дослідів	л. ВІР 44 (♀)		г. Слава (F ₁)		л. ВІР 38 (♂)		г. Слава (♀)		г. ВІР 42 (F ₁)		г. Світоч (♂)	
	F _v /F ₀	τ _{1/2} , с	F _v /F ₀	τ _{1/2} , с	F _v /F ₀	τ _{1/2} , с	F _v /F ₀	τ _{1/2} , с	F _v /F ₀	τ _{1/2} , с	F _v /F ₀	τ _{1/2} , с
Контроль (%)	1,20 100%	56	1,65 100%	48	0,86 100%	70	1,65 100%	48	1,50 100%	50	1,40 100%	52
ЛКМ (500 мкг/мл)	1,05 87,5%	58	0,82 49,5%	54	0,70 81,4%	72	0,82 49,5%	54	0,77 51,2%	54	0,62 44,6%	54
% інгібування	12,5%	-	50,5%	-	18,6%	-	50,5%	-	48,8%	-	55,4%	-
ЦГІ (100 мкг/мл)	0,48 40,0%	57	0,86 52,0%	65	0,32 37,2%	71	0,86 52,0%	55	75,8 50,5%	70	0,63 45,0%	67
% інгібування	60,0%	-	48,0%	-	62,8	-	48,0%	-	49,5%	-	55,0%	-

Отримані нами експериментальні докази свідчать про існування своєрідної функціональної комплементатії пластидної та цитоплазматичних білоксинтезуючих систем у формуванні функціонально активного хлоропласту у гетерозисних гібридних організмів.

Список літератури

- Біоенергетические процессы при гетерозисе / под ред. Л.В.Хотылевой. – Минск: Наука и техника, 1991. – 176с.
- Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. – М.: Высшая школа, 1975. – 392с.
- Дудник И.В., Вахидова Л.Р., Гиллер Ю.В. Влияние специфических ингибиторов биосинтеза белка на полипептидный состав субмембранных частиц хлоропластов // Докл. АН Тадж. ССР. – 1990. – №3. – С. 196–198.
- Закирьянов Ф.К., Караваев В.А., Кукушкин А.К. О связи характерных времен переходных процессов с активностью темновых процессов фотосинтеза // Биофизика. – 1992. – Т.37, вып.2. – С. 219–221.
- Костышин С.С., Масікевич Ю.Г. Молекулярно-биохимические аспекты «хлоропластного» гетерозиса у кукурузы // Молекул. генетика и биофизика. – 1984. – Вып. 9. – С. 99–104.
- Ладыгина М.Е., Рубин Б.А. Биолюминесцентный метод количественного определения отдельных компонент адениловой системы // В кн.: Биофизические методы в физиологии растений (под ред. Б.А.Рубина). – М.: Наука, 1971. – С. 72–84.
- Маслов Ю.Т. Статистическая обработка данных биохимических исследований // В кн.: Методы биохимического анализа растений. – Ленинград: Наука, 1978. – С. 163–187.
- Овчинникова М.Ф. Комплементация хлоропластов кукурузы // С.-х. биология. – 1976. – Т.11, №5. – С. 675–679.
- Струнников В.А., Струнникова Л.В. Гетерозис можно закрепить в потомстве! // Природа. – 2003. – №1. – С. 3–8.
- Турбин Н.В. Гетерозис и генетический баланс // В кн.: Гетерозис (под ред. Н.В.Турбина). – Минск: Изд-во АН БССР, 1961. – С. 3–34.
- Яковлев А.П. Физиологические основы гетерозиса и его прогнозирование у растений. Автореф. дис ... докт. биол. наук. – М., 1971. – 52с.
- Arnon D.J. Conversion of light into chemical energy in photosynthesis // Nature. – 1954. – Vol.184, №1. – P. 10–21.
- East E. M. Heterosis // Genetics. – 1936. – Vol.21. – P. 375–397.
- Herrmann R.G. The preparation of circular DNA from plastids // Methods in chloroplast molecular biology. – New York, London: Proc. Nat. Adv., 1982. – P. 259–280.
- Jones D.F. Gene action in heterosis // Genetics. – 1957. – Vol.42. – P. 93–103.
- Srivastava H.K. Intergenomic interaction, heterosis, and improvement of crop yield // Adv. Agronom. – 1981. – Vol.34. – P. 117–195.

ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ ОБУСЛОВЛЕННОСТЬ СВЕТОВЫХ РЕАКЦИЙ ХЛОРОПЛАСТОВ ГЕТЕРОЗИСНЫХ ГИБРИДОВ КУКУРУЗЫ Ю.Г.Масікевич

Исследовано влияние ингибиторов белкового синтеза – линкомицина и циклогексимида на проявление фотофизических и фотохимических реакций фотосинтеза у гетерозисных гибридов кукурузы и их исходных форм. Показано, что гибридизация на гетерозис сопровождается повышением автономии хлоропластов относительно основных фотоэнергетических процессов: переноса электронов по электронтранспортной цепи (ЭТЦ) и фотофосфорилирования.

Ключевые слова: *гетерозис, фотосинтетический аппарат, реакция Хилла, фотофосфорилирование, флуоресценция, ингибиторная техника.*

**THE NUCLEAR-CYTOPLASMATIC CONDITION OF CHOLOROPLASTS LIGHT REACTIONS OF
HETEROSISE MAIZE HYBRIDS****Yu.H.Masikevich**

The influence of inhibitors of protein synthesis – lincomycine and cycloheximide on the manifestation of photophysical and photochemical reactions of photosynthesis in heterosise maize hybrids and its starting forms was studied. It was demonstrated, that the hybridization for heterosis is accompanied by increase of autonomy of chloroplasts pertaining to general photoenergetical processes: electrons moving on electrontransport chain and photophosphoryling.

Key words: *heterosis, photosynthetic apparatus, Hill's reaction, photophosphoryling, fluorescence, inhibitor's technics.*

Представлено В.П.Шапоревим

Рекомендовано до друку Л.І.Воробйовою