

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ РОСЛИН І ГЕНЕТИКИ

На правах рукопису

ПОРУБЬЛОВА  
Лариса Василівна

МІНЛИВІСТЬ ПІГМЕНТ-БІЛКОВИХ КОМПЛЕКСІВ ХЛОРОПЛАСТІВ  
МЕЗОФІЛУ ІНВРЕДНИХ ЛІНІЙ КУКУРУДЗИ

03.00.12 - фізіологія рослин

А в т о р е ф е р а т  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ - 1995



00778491 (-)

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі  
Інституту фізіології рослин

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор  
Кочубей Світлана Михайлівна

Офіційні опоненти: доктор хімічних наук,  
член-кореспондент НАН України  
Ясников Олександр Олександрович

кандидат біологічних наук  
Стасик Олег Остапович

Провідна установа: Національний аграрний університет  
м. Київ

Захист дисертації відбудеться *«23» серпня* 1996 року  
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 016.57.01 по захисту  
дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора наук при Інсти-  
туті фізіології рослин і генетики НАН України за адресою: 252022,  
Київ-22, вул. Васильківська, 31/17.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту фі-  
зіології рослин і генетики НАН України.

Автореферат розісланий *«23» серпня* 1996 року

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

*В. А. Труханов*  
Труханов В. А.

ЛНБ ім. В. Стефаніка  
АН України

43-31.736

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність і ступінь дослідженості тематики дисертації. Останнім часом все більше уваги в роботах багатьох вчених світу приділяється динаміці організації тилакоїдних мембран при зміні умов зовнішнього середовища. Проте, зараз відомі тільки зміни відносної кількості пігмент-білкових комплексів (ПБК) у складі фотосинтетичних мембран. Серед основних ПБК особливу увагу привертає світло-збиральний комплекс фотосистеми 2 (СЗК2). Протягом багатьох років вважалося, що він виконує тільки пасивну роль: збирає світло і передає його на реакційні центри. Проте, у 80-х роках з'явилися роботи Веннета, Аллена та деяких інших вчених щодо фосфорилування поліпептидів СЗК2, які виявили регуляторну функцію фосфорильованого комплексу у так званих short-term процесах, тобто у перебудовах мембранної системи тилакоїдів у ході здійснення світлової фази фотосинтезу протягом досить коротких відрізків часу. В останній час з'явилися дані, які дозволяють припустити, що СЗК2 може брати участь у регуляторних процесах, які розвиваються протягом більш довгих часових інтервалів. Це, головним чином, адаптаційні процеси, в реалізації яких бере участь генетичний апарат. Досить цікавими є дані про те, що поліпептиди світло-збирального комплексу кодуються мультигенною ядерною родиною так званих sav-генів, число яких перевищує кількість протеїнів в фотосинтетичних мембранах, які вдається виявити біохімічними методами. У зв'язку з цим з'явилось припущення, що, можливо, це перевищення являє собою резервування генетичного потенціалу, який може бути реалізованим при тих чи інших стресових умовах. Було висловлено також припущення, що реакцією на стрес може бути зміна відносної кількості основних поліпептидів СЗК2, які завжди присутні в фотосинтетичних мембранах і досить легко виявляються. Таким чином, на сьогодні існує думка про те, що СЗК2 може приймати участь також і в регуляторних процесах, котрі мають адаптаційний характер.

За результатами робіт, в яких вивчали зміни відносної кількості ПБК в тилакоїдних мембранах, склалась думка, що СЗК2 є одним з найбільш мобільних мембранних комплексів у реакціях фотосинтетичного апарату на зміну умов зовнішнього середовища. Так, вважалося, що збільшення вмісту хлорофілу в листках, яке спостерігалось для ряду рослин при затінненні, обумовлене зростанням СЗК2 (Leong and Anderson, 1984), або ж, що зменшення хлорофілу в умовах дефіциту азоту обумовлене зниженням кількості СЗК2 (Plumley and Schmidt, 1989). Проте, в роботах відділу біохімії фотосинтезу (Кочубей та ін., 1992) було виявлено, що зміни відносної кількості СЗК2 у тилакоїдних мембранах кукурудзи в залежності від інтенсивності освітленості мають різну динаміку для хлоропластів двох інбредних ліній кукурудзи. Ці результати поставили питання про те, чи обумовлена динаміка СЗК2 реальними змінами його накопичення в мембранах, чи варіаціями його відносної кількості, які виявляються завдяки варіаціям також і інших ПБК в цих умовах. Тому постала необхідність разом із змінами вмісту хлорофілу дослідити зміни саме накопичення окремих ПБК мембран тилакоїдів, а не зміни їх відносної кількості. Такі дослідження могли б стати основою для подальшого вивчення процесів біосинтезу цих важливих мембранних компонентів, а також механізмів його регуляції у відповідь на зміни умов зовнішнього середовища. Поряд з цим було цікавим вивчити можливі варіації відносної кількості основних поліпептидів СЗК2 при рівних стресах для перевірки ідеї про те, що такі варіації можуть бути однією з адаптаційних реакцій.

Мета та основні завдання наукових досліджень. Мета роботи полягала у в'ясуванні реакції фотосинтетичного апарату на три типи найбільш поширених стресів: затіннення, зниження рівня азотного живлення і зниження температури в порівнянні з оптимальними. Планувалось вивчити ту частину реакцій, яка торкалась змін накопичення ПБК тилакоїдних мембран з тим, щоб відповісти на питання: чи дійсно кількісні ва-

ріації СЗК2 дають переважний вклад у зміни фотосинтетичного апарату, а також чи змінюється відносна кількість основних поліпептидів СЗК2. Для того, щоб уникнути розбіжностей у результатах, які могли б бути зумовленими різницею реакції на стрес у різних видів, дослідження були проведені в різних інбредних лініях кукурудзи.

Згідно з цим були поставлені наступні завдання:

1. Дослідити зміни вмісту хлорофілів а і b в інбредних лініях кукурудзи в залежності від освітленості, рівня азотного живлення і температури при вирощуванні.
2. Виявити вплив укаваних умов вирощування на зміну вмісту основних пігмент-білкових комплексів у тилакоїдних мембранах хлоропластів інбредних ліній кукурудзи.
3. Дослідити зміни відносної кількості основних поліпептидів світло-збирального комплексу хлоропластів інбредних ліній кукурудзи в залежності від умов вирощування.

Наукова новизна досліджень. Вперше були проведені виміри вмісту в хлоропласті основних пігмент-білкових комплексів і було показано, що зміни концентрації хлорофілу в листях та хлоропластах при зниженні рівнів освітленості, азотного живлення та температури обумовлені односторонніми змінами вмісту пігмент-білкових комплексів усіх типів, які кодується як хлоропластним, так і ядерним геномами. Показано, що норма реакції на стрес є різною для ядерного та хлоропластного генів і відрізняється в різних генотипах. Виявлено, що зміни відносної кількості основних поліпептидів світло-збирального комплексу рівні при дії різних стресів, і кількісні показники цих змін відрізняються для різних інбредних ліній, а також пов'язані з нормою реакції цілого світло-збирального комплексу.

Теоретична та практична цінність досліджень. Одержані нові дані, важливі для розвитку динамічної моделі організації фотосинтетичного апарату вищих рослин, а також шляхів регуляції його стану. Виявлення

незалежності і специфічності регуляції хлоропластного і ядерного геномів може бути використане для одержання цікавих комбінацій при створенні гібридних рослин.

Апробація роботи. За матеріалами дисертації зроблені доповіді на II в'язді Українського товариства фізіологів рослин (Київ, 1993), а також на наукових семінарах відділу біохімії фотосинтезу та екології фотосинтезу.

Структура і обсяг дисертаційної роботи. Дисертація складається із списку основних скорочень, вступу, літературного огляду, опису матеріалів та методів дослідження, трьох розділів експериментальної частини, закінчення, висновків, списку літератури, який містить 218 назв, в тому числі 203 зарубіжних. Робота викладена на 119 сторінках друкованого тексту і містить 13 таблиць, 11 малюнків.

Положення, яке виноситься на захист. Реакція на стрес пігментного апарату у мезофільних тканинах рослин кукурудзи виражається в зміні вмісту в тилакоїдних мембранах хлоропластів обох типів пігмент-білкових комплексів, які кодуються як хлоропластним, так і ядерним геномами. Змінюється також співвідношення між пігмент-білковими комплексами завдяки різниці у нормі реакції геномів обох типів. Ці зміни рівні для рівних генотипів.

Особистий внесок дисертанта у розробку наукових результатів. Дисертант проробила відповідну літературу та оволоділа необхідними методами дослідження, брала участь у плануванні дослідів. Використовуючи технічну базу відділу та інституту, вона самостійно виконала дисертаційну роботу.

Об'єкти і методи досліджень. Об'єктами досліджень були інбредні лінії кукурудзи (*Zea mays*) ПЗ46, F7, ЧК209, ПБ02, які відрізняються за комбінаційною здатністю. Рослини вирощували на вегетаційній площадці протягом літніх сезонів 1992 і 1993 років, середня освітленість становила близько  $100 \text{ Вт/м}^2$  і  $30 \text{ Вт/м}^2$  відповідно, а середня денна

температура - відповідно 25-30°C та біля 18°C. В дослідях по вивченню впливу освітленості частина рослин притінялася до рівня до 9 Вт/м<sup>2</sup> в дослідях 1992р. та 3 Вт/м<sup>2</sup> в дослідях 1993р. Для вивчення впливу рівня азотного живлення рослини вирощували в пісчаній культурі. В пісок додавали мінеральну суміш Гельрігеля. В дослідному варіанті рівень азоту становив 1/10 від рівня контролю. У дослідях по впливу температури рослини, які вирощували в теплиці при освітленості близько 90 Вт/м<sup>2</sup> і температурі 22-32°C протягом 3 тижнів, переносили на 10 годин в кліматичні камери ВКШ-1 та КНТ (температура 28°C і 5°C відповідно, освітленість 30 Вт/м<sup>2</sup>).

Виділення хлоропластів мезофілу кукурудзи проводили в верхніх повністю сформованих листків 3-4-тижневих рослин за методикою (Островская та ін., 1978). Концентрації хлорофілу визначали спектрофотометрично в спиртових екстрактах з наступним розрахунком по системі рівнянь Вінтерманса (Winthermans, 1964). Аналіз вмісту хлорофіл-білкових комплексів із суспензії, в якій попередньо підраховували кількість хлоропластів в одиниці об'єму, проводили шляхом електрофорезу у поліакриламідному гелі за модифікованим методом Андерсон (Anderson J.M., 1980). Вміст ПБК в одному хлоропласті розраховували по площі під відповідними смугами на денситограмах, та відомих сумарної кількості хлорофілу і кількості хлоропластів, що були нанесені на трек геля. Ре-електрофореz вон хлорофіл-білкових комплексів, одержаних після електрофорезу за методом Андерсон, проведено у буферній системі за методом Лаемлі (Laemmli, 1970). Запис кривих індукції флуоресценції здійснювали на однопроменевому приладі, який було вібрано у відділі біохімії фотосинтезу ІФРГ НАН України.

#### ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ

Вплив змінення рівня освітленості на фотосинтетичний апарат. Виміри вмісту хлорофілу (Схл) в листях та хлоропластах при двох рівнях освітленості виявили, що реакцією рослин кукурудзи на затінення при

інших однакових умовах в підвищення вмісту хлорофілу в листях та хлоропластах (табл.1), хоча ця реакція була рівною в різних лініях. Найсильніше на затінення реагувала лінія ЧК209, а реакція хлоропластів лінії ПЗ46 була найменшою. Вміст хлорофілу в листях та хлоропластах в дослідях 1993 р. був меншим на відміну від попереднього сезону. Очевидно, більш низькі температури обумовили зменшення швидкості біосинтезу хлорофілу, так що його накопичення навіть в умовах зниженої освітленості 1993 р. було більш низьким. Крім того, зміни Схл при затіненні більш значні для хлоропластів і слабше проявляються для листя. Можливо, це пояснюється тим, що реакція на затінення пов'язана не тільки зі збільшенням Схл у хлоропласті, але і з варіаціями їх кількості в клітині, внаслідок чого і може виникнути деяке вирівнювання відмінностей Схл в листях.

Таблиця 1.

Вміст хлорофілу в хлоропластах та листях різних інбредних ліній кукурудзи в залежності від освітленості

| Об'єкт  | лист               |     |                    |     | хлоропласт                            |     |                                       |     |
|---------|--------------------|-----|--------------------|-----|---------------------------------------|-----|---------------------------------------|-----|
|         | 1992               |     | 1993               |     | 1992                                  |     | 1993                                  |     |
|         | мг/дм <sup>2</sup> | %   | мг/дм <sup>2</sup> | %   | $\frac{10^{-10}\Gamma}{\text{ХЛ-СТ}}$ | %   | $\frac{10^{-10}\Gamma}{\text{ХЛ-СТ}}$ | %   |
| ПЗ46 С* | 3.1±0.2            | 100 | 2.8±0.2            | 100 | 12.5±1.0                              | 100 | 9.7±2.4                               | 100 |
| ПЗ46 Т* | 3.5±0.2            | 113 | 3.1±0.2            | 111 | 17.2±1.0                              | 138 | 11.5±1.6                              | 119 |
| Ф7 С    | 3.7±0.1            | 100 | 3.2±0.2            | 100 | 12.7±1.3                              | 100 | 8.8±1.4                               | 100 |
| Ф7 Т    | 4.0±0.1            | 108 | 3.9±0.3            | 122 | 24.5±2.2                              | 193 | 13.4±1.7                              | 152 |
| ЧК209 С | 2.9±0.2            | 100 | 2.5±0.1            | 100 | 10.7±2.0                              | 100 | 8.7±1.3                               | 100 |
| ЧК209 Т | 3.3±0.1            | 114 | 3.0±0.1            | 120 | 24.7±2.3                              | 231 | 13.6±2.0                              | 158 |
| П502 С  | 3.7±0.1            | 100 | 3.2±0.1            | 100 | 9.4±1.3                               | 100 | 10.1±2.3                              | 100 |
| П502 Т  | 4.1±0.2            | 111 | 3.4±0.1            | 106 | 15.0±3.0                              | 160 | 16.7±1.8                              | 165 |

\* С, Т - освітленість 100 і 9 Вт/м<sup>2</sup> (1992р.) та 30 і 3 Вт/м<sup>2</sup> (1993р.) відповідно.

Таким чином, серія дослідів 1992 та 1993 років виявили відтворювальні відмінності між лініями по вмісту хлорофілу на одиницю площі листа та хлоропласт.

Інбредні лінії в контрольних варіантах достовірно не відрізнялися ні за вмістом пігмент-білкових комплексів реакційних центрів (ПБК РЦ), ні СЗК2 (табл.2). В умовах більш низьких температур 1993 р. ці значення були нижчі для всіх ліній, крім П502. При затіненні виявляється достовірно збільшення ПБК РЦ і СЗК2 для всіх ліній кукурудзи, окрім ПБК РЦ П346. В дослідях 1993 р. збільшення як ПБК РЦ, так і СЗК2 в затінених варіантах було значно меншим.

Таблиця 2.

Вміст пігмент-білкових комплексів у хлоропластах рівних інбредних ліній кукурудзи в залежності від рівня освітленості

| Об'єкт   | ПБК РЦ (ФС1 + ФС2) |     |         |     | СЗК2     |     |         |     |
|----------|--------------------|-----|---------|-----|----------|-----|---------|-----|
|          | 1992               |     | 1993    |     | 1992     |     | 1993    |     |
|          | СпБК*              | %   | СпБК    | %   | СпБК     | %   | СпБК    | %   |
| П346 С** | 6.5±1.3            | 100 | 5.6±1.8 | 100 | 5.9±1.2  | 100 | 4.9±1.0 | 100 |
| П346 Т** | 8.6±1.6            | 132 | 5.5±1.0 | 100 | 8.7±1.2  | 147 | 5.4±0.9 | 110 |
| F7 С     | 6.0±1.2            | 100 | 3.8±0.8 | 100 | 6.6±1.6  | 100 | 4.1±0.7 | 100 |
| F7 Т     | 9.3±0.7            | 155 | 5.4±1.3 | 142 | 15.3±2.2 | 230 | 6.1±1.5 | 149 |
| ЧК209 С  | 5.0±1.1            | 100 | 3.8±0.8 | 100 | 5.6±1.0  | 100 | 4.5±0.9 | 100 |
| ЧК209 Т  | 11.7±1.4           | 234 | 5.9±1.2 | 155 | 13.0±1.5 | 232 | 7.4±0.8 | 164 |
| П502 С   | 4.9±1.2            | 100 | 5.1±1.5 | 100 | 4.5±1.4  | 100 | 5.4±1.5 | 100 |
| П502 Т   | 7.9±0.6            | 161 | 8.2±0.9 | 160 | 7.2±0.7  | 160 | 8.2±1.0 | 150 |

\* СпБК - вміст пігмент-білкового комплексу в хлоропласті в  $10^{-10}$  г хлорофілу на хлоропласт, що відповідає кількості хлорофілу в пігмент-білкових комплексах в перерахунку на хлоропласт, розрахованого по площі під полюсом на електрофореграмі в відомою кількість хлорофілу

\*\* С,Т - освітленість 100 і 9 Вт/м<sup>2</sup>(1992р) та 30 і 3 Вт/м<sup>2</sup>(1993р) відповідно.

Аналіз результатів, отриманих в 1992 році, дозволяє дійти висновку, що мінімальні зміни ПБК РЦ і СЗК2 виявляються в лініях П346, максимальні - в ЧК209. В лініях П346 і F7 сильніше збільшуються СЗК2, а в ЧК209 і П502 приблизно однаково змінюються як ПБК РЦ, так і СЗК2. Цей характер змін підтверджується дослідями 1993 року, хоч і амплітуди змін ПБК у хлоропластах були нижчими для всіх ліній, крім П502, для якої і цього року спостерігалось приблизно таке саме збільшення

обох типів ПБК. Результати досліджень змін ПБК протягом двох сезонів, які відрізнялися за погодними умовами, показують, що рівень накопичення обох ПБК за несприятливих умов літа 1993р. був нижчим як в контрольних варіантах, так і в ватинених порівняно з даними 1992 року. Причиною цього, очевидно, є зниження рівня біосинтезу компонентів ПБК при зниженні температури.

Таким чином, всупереч досить поширеній думці про те, що збільшення вмісту хлорофілу в листях при ватиненні обумовлено зростанням СЗК2, можна твердити, що в це збільшення дають вклад і ПБК РЦ також. Причому, зростання в хлоропласті вмісту останніх може бути майже однаковим із зростанням СЗК2, як це можна бачити для ліній ПЗ46, ПБ02 і ЧК209. Крім того, для рівних генотипів, навіть в межах одного і того ж виду, зростання відносної кількості ПБК різних типів відбувається по-різному. Тобто норма реакції відповідних геномів різна.

**Вплив рівня азотного живлення на фотосинтетичний апарат.** Дефіцит азотного живлення викликав значне зменшення Схл (табл.3) як в перерахунку на одиницю площі листа, так і на хлоропласт. З таблиці видно, що і на цей стрес реакція Схл виявилася різною для різних ліній: найменші зміни спостерігалися як в листях, так і хлоропластах лінії ЧК209, а найбільші - в лінії ПБ02.

Виміри вмісту ПБК з перерахунком на один хлоропласт показують, що зменшення рівня азоту викликало значне зменшення вмісту як ПБК РЦ, так і СЗК2 (табл.4). Амплітуди змін були близькими за величиною в серіях дослідів 1992 та 1993 років. В обох серіях дослідів найменші зміни спостерігалися в хлоропластах ліній ЧК209. Найбільших змін зазнали ПБК в хлоропластах ліній F7 та ПБ02. Крім того, відрізнялися за нормою реакції ПБК РЦ та СЗК2, котрі, як відомо, кодуються хлоропластним та ядерним геномами відповідно. В хлоропластах ліній F7 і ЧК209 в обох серіях дослідів спостерігалося більш значне зменшення реакційних центрів. В хлоропластах лінії ПЗ46 в 1992 році спостерігалося сильні-

Таблиця 3.

Вміст хлорофілу в хлоропластах та листях різних інбредних ліній кукурудзи в залежності від рівня азотного живлення

| Об'єкт  | лист               |     |                    |     | хлоропласт                   |     |                              |     |
|---------|--------------------|-----|--------------------|-----|------------------------------|-----|------------------------------|-----|
|         | 1992               |     | 1993               |     | 1992                         |     | 1993                         |     |
|         | мг/дм <sup>2</sup> | %   | мг/дм <sup>2</sup> | %   | 10 <sup>-10</sup> г<br>хл-ст | %   | 10 <sup>-10</sup> г<br>хл-ст | %   |
| ПЗ46 Н* | 3.5±0.3            | 100 | 2.8±0.2            | 100 | 17.1±3.3                     | 100 | 9.7±0.2                      | 100 |
| ПЗ46 Д* | 1.6±0.7            | 46  | 0.9±0.1            | 62  | 5.3±1.8                      | 30  | 2.4±0.2                      | 25  |
| F7 Н    | 4.1±0.1            | 100 | 3.2±0.3            | 100 | 9.5±2.4                      | 100 | 8.8±1.4                      | 100 |
| F7 Д    | 1.6±0.1            | 40  | 0.7±0.1            | 22  | 2.0±0.4                      | 20  | 1.9±0.5                      | 20  |
| ЧК209 Н | 3.1±0.4            | 100 | 2.5±0.1            | 100 | 9.7±3.0                      | 100 | 8.7±1.3                      | 100 |
| ЧК209 Д | 1.4±0.3            | 45  | 0.7±0.1            | 28  | 6.0±1.9                      | 60  | 3.6±0.1                      | 40  |
| П502 Н  | 4.5±0.2            | 100 | 3.2±0.1            | 100 | 15.5±3.8                     | 100 | 8.4±0.9                      | 100 |
| П502 Д  | 1.3±0.4            | 30  | 0.9±0.1            | 28  | 2.8±0.6                      | 18  | 2.7±0.2                      | 32  |

\*Н, Д - норма і 1/10 норми азоту в суміші Гельрігеля відповідно.

Таблиця 4.

Вміст пігмент-білкових комплексів в хлоропластах інбредних ліній кукурудзи в залежності від рівня азотного живлення

| Об'єкт   | ПБК РЦ (ФС1 + ФС2) |     |         |     | СЗК2    |     |         |     |
|----------|--------------------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|-----|
|          | 1992               |     | 1993    |     | 1992    |     | 1993    |     |
|          | СПБК*              | %   | СПБК    | %   | СПБК    | %   | СПБК    | %   |
| ПЗ46 Н** | 8.7±0.7            | 100 | 5.6±0.1 | 100 | 8.4±0.1 | 100 | 4.9±1.0 | 100 |
| ПЗ46 Д** | 3.3±1.3            | 38  | 1.3±0.2 | 23  | 2.1±0.5 | 25  | 1.4±0.2 | 29  |
| F7 Н     | 5.6±3.1            | 100 | 3.8±0.8 | 100 | 3.9±0.9 | 100 | 4.1±0.7 | 100 |
| F7 Д     | 0.9±0.5            | 16  | 0.8±0.1 | 21  | 1.1±0.1 | 28  | 1.0±0.2 | 24  |
| ЧК209 Н  | 4.3±0.1            | 100 | 3.8±0.8 | 100 | 5.4±0.2 | 100 | 4.5±0.9 | 100 |
| ЧК209 Д  | 2.5±0.4            | 58  | 1.4±0.1 | 37  | 3.6±0.7 | 67  | 2.0±0.4 | 45  |
| П502 Н   | 8.1±1.0            | 100 | 5.1±1.5 | 100 | 7.4±1.1 | 100 | 5.4±1.5 | 100 |
| П502 Д   | 1.3±0.4            | 16  | 1.0±0.1 | 20  | 1.5±0.6 | 20  | 1.3±0.3 | 24  |

\* СПБК - значення вмісту ПБК в 10<sup>-10</sup>г хл в хлоропласті.

ше зменшення СЗК2, а в лінії П502 в обох серіях дослідів спостерігалося приблизно однакове зменшення ПБК обох типів. Тобто, накопичення білків СЗК2 в хлоропластах лінії ЧК209 виявилось найбільш стійким.

Таким чином, дефіцит азотного живлення призводить до значного зменшення всіх ПБК: як ПБК РЦ, так і ПБК СЗК2. Причому, вклад у зменшення вмісту хлорофілу в листях та хлоропластах дають як ПБК РЦ, так і СЗК2, що виявляється при порівнянні даних, наведених у таблицях 3 і 4. Слід також відзначити, що накладення температурного стресу на стрес по азотному живленню викликає додаткове зменшення ПБК всіх типів і знижує різницю між падінням вмісту ПБК різних типів. В різних генотипах може відбуватися переважне зменшення або ПБК РЦ, або СЗК2, або обидва вони можуть зменшуватись приблизно однаково, як це має місце для лінії П502. Тобто, навіть в межах одного і того ж виду рослин норма реакції хлоропластного і ядерного геномів на стрес є рівною для різних генотипів. Крім того, вона може бути рівною для цих двох геномів у одного і того ж генотипу. Це, мабуть, свідчить про те, що шляхи регуляції цих двох геномів рівні.

Вплив температури на фотосинтетичний апарат. Вивчення зміни вмісту хлорофілу в хлоропластах інбредних ліній кукурудзи показало, що при зниженні температури від 28°C до 5°C спостерігається зменшення цього параметру (табл. 5). Найбільші зміни були в хлоропластах лінії F7, а найменші - в лінії П346. Відношення хл а/б достовірно не змінювалося.

Таблиця 5.

Вміст хлорофілу та відношення хл а/б в хлоропластах інбредних ліній кукурудзи в залежності від температури вирощування

| Об'єкт     | Відношення хл а/б | Вміст хлорофілу                |     |
|------------|-------------------|--------------------------------|-----|
|            |                   | 10 <sup>-10</sup> г/хлоропласт | %   |
| П346 28°C  | 2.6 ± 0.3         | 10.4 ± 0.9                     | 100 |
| П346 5°C   | 2.3 ± 0.4         | 9.2 ± 0.3                      | 90  |
| F7 28°C    | 2.9 ± 0.2         | 10.5 ± 0.9                     | 100 |
| F7 5°C     | 2.6 ± 0.2         | 7.6 ± 0.8                      | 70  |
| ЧК209 28°C | 2.5 ± 0.1         | 7.0 ± 1.2                      | 100 |
| ЧК209 5°C  | 2.5 ± 0.8         | 5.0 ± 0.5                      | 80  |
| П502 28°C  | 2.8 ± 0.1         | 7.0 ± 0.9                      | 100 |
| П502 5°C   | 2.9 ± 0.1         | 5.7 ± 0.9                      | 80  |

Перерахунок на хлоропласт показує, що при зниженні температури спостерігається зменшення вмісту всіх пігмент-білкових комплексів, причому ПБК реакційних центрів зменшується сильніше (табл. 6.). Ста-

Таблиця 6.

Вміст основних пігмент-білкових комплексів у хлоропластах інбредних ліній кукурудзи в залежності від температури вирощування.

| Об'єкт    | ПБК РЦ (ФС1+ФС2) |     | СЗК2            |     | Відношення ПБК РЦ (ФС1+ФС2) до СЗК2 |
|-----------|------------------|-----|-----------------|-----|-------------------------------------|
|           | $10^{-10}$ г Хл  | %   | $10^{-10}$ г Хл | %   |                                     |
|           | хлоропласт       |     | хлоропласт      |     |                                     |
| ПЗ46 28°C | 5.0 ± 0.4        | 100 | 5.5 ± 0.3       | 100 | 0.9 ± 0.1                           |
| ПЗ46 5°C  | 4.3 ± 0.1        | 86  | 4.8 ± 0.1       | 87  | 0.9 ± 0.1                           |
| F7 28°C   | 4.4 ± 0.3        | 100 | 5.5 ± 0.4       | 100 | 0.8 ± 0.1                           |
| F7 5°C    | 3.1 ± 0.6        | 70  | 4.4 ± 0.5       | 80  | 0.7 ± 0.1                           |

тистично достовірні відмінності між рівнями накопичення ПБК у двох різних інбредних лініях спостерігаються тільки для суми ПБК реакційних центрів. Неможливість спостерігати достовірну різницю в накопиченні СЗК2 обумовлена тим, що, мабуть, величина похибки методу підрахунку хлоропластів у суспензії дорівнює величині зміни кількості СЗК2. Реакція двох ліній кукурудзи на температурний стрес була однаковою: якщо в хлоропластах лінії ПЗ46 спостерігається майже однаковий рівень зниження ПБК РЦ і СЗК2, то в лінії F7 більш значимим було зниження вмісту ПБК РЦ. Відповідно зменшується в лінії F7 відношення ПБК РЦ до СЗК2.

Таким чином, зниження вмісту хлорофілу є закономірною реакцією рослинного організму на зниження температури. Крім того, так як і для других типів стресу, можна твердити, що норма реакції є однаковою для хлоропластного і ядерного геномів і специфічною для різних генотипів.

Вивчення кривих індукції флуоресценції (табл. 7) виявило зменшення параметрів  $F_v/F_{max}$  і  $F_v/F_o$  в "холодних" варіантах ліній ПЗ46 і F7 порівняно з контролем, що свідчить про зниження нециклічного

Таблиця 7.

Параметри кривих індукції флуоресценції хлоропластів інбредних ліній кукурудзи, вирощених за різних температурних умов.

| Об'єкт    | $F_v/F_{max}$ | %   | $F_v/F_0$ | %   | $(F_{p1} - F_0)/F_v$ | %   |
|-----------|---------------|-----|-----------|-----|----------------------|-----|
| ПЗ46 28°C | 0.68±0.04     | 100 | 2.21±0.44 | 100 | 0.12                 | 100 |
| ПЗ46 5°C  | 0.57±0.01     | 84  | 1.30±0.10 | 59  | 0.24                 | 200 |
| F7 28°C   | 0.62±0.03     | 100 | 1.60±0.10 | 100 | 0.13                 | 100 |
| F7 5°C    | 0.56±0.05     | 90  | 1.22±0.04 | 76  | 0.33                 | 254 |

електронного транспорту, причому сильніше в лінії ПЗ46. Значних змін вазнав і такий параметр, як  $(F_{p1} - F_0)/F_v$ , що відображає вміст  $Q_B$ -невідновлюючих реакційних центрів. Згідно Мелісу,  $F_{p1}$  рівень характеризує вміст в мембранах тилакоїдів так званої  $\Phi C2\beta$ , яка містить у собі  $Q_B$ -невідновлюючі реакційні центри і має зменшений пул світлозбирального комплексу за рахунок втрати периферійного пулу. Параметр  $(F_{p1}-F_0)/F_v$  характеризує відносну долю  $\Phi C2\beta$  в порівнянні із звичайною  $\Phi C2$ , так званою  $\Phi C2\alpha$ . Більш сильне підвищення параметру  $(F_{p1}-F_0)/F_v$  спостерігається для хлоропластів лінії F7 при зниженні температури, і тому слід вважати, що для цього варіанту має місце більше накопичення  $\Phi C2\beta$  (табл.7), тобто комплексу  $\Phi C2$  зі зменшеним світлозбиральним комплексом. Згідно сучасних уявлень, зростання вмісту  $\Phi C2\beta$  в мембранах хлоропластів свідчить про посилення процесу фотоінгібування. Тому можна вважати на підставі даних таблиці 7, що при зниженні температури зростає фотоінгібування в хлоропластах обох ліній кукурудзи, причому сильніше для F7. З цього випливає, що фотоінгібування дає вклад до спостереженого зниження нециклічного транспорту. Із таблиці 7 також видно, що електронний транспорт сильніше зменшується для хлоропластів лінії ПЗ46. Це означає, що хоча фотоінгібування для цього об'єкту менше, проте, очевидно, є інші чинники, які знижують електронний транспорт. До їх числа, зокрема, відносяться величина перетину поглинання і вміст комплексів  $\Phi C1$  і  $\Phi C2$ . Як випливає з таблиці 6, перший чинник майже не змінюється для ПЗ46 - співвідношення ПБК РЦ 1.

СЗК2 однакове для контролю і досліду, але спостерігалось зменшення відносної кількості ПБК РЦ ФС1 і саме для того ПБК, котрий, як ми вважаємо, пов'язаний із функціонуванням нециклічного транспорту. Для лінії F7 цей ПБК майже не змінюється, а перетин поглинання навіть збільшується, завдяки відносному збільшенню СЗК2 (табл. 6). Тому можна припустити, що більше зниження електронного транспорту в хлоропластах лінії ПЗ46 відбувається саме завдяки зниженню вмісту реакційних центрів ФС1.

Вплив умов вирощування на поліпептидний склад світлозбирального комплексу. Дослідження зміни основних поліпептидів СЗК2 - 27kDa і 25kDa - у відповідь на зниження рівнів освітленості, азотного живлення та температури виявило досить значні відмінності у реакції ліній, які досліджувалися (табл. 8). Так, зниження рівня освітленості при вирощуванні рослин викликало збільшення співвідношення 27kDa/25kDa поліпептидів в СЗК2 у всіх лініях кукурудзи, за винятком ПБ02, для якої спостерігалось зменшення цього співвідношення у всіх дослідках,

Таблиця 8.  
Вплив умов вирощування на відношення 27kDa/25kDa поліпептидів СЗК2 в інбредних лініях кукурудзи

| Об'єкт  | Умови вирощування            |     |             |     |             |     |
|---------|------------------------------|-----|-------------|-----|-------------|-----|
|         | 100/9 (Вт/м <sup>2</sup> )** |     | 1N/0.1N**   |     | 28°C/5°C**  |     |
|         | 27kDa/25kDa                  | %   | 27kDa/25kDa | %   | 27kDa/25kDa | %   |
| ПЗ46 К* | 1.86 ± 0.21                  | 100 | 2.05 ± 0.41 | 100 | 1.84 ± 0.15 | 100 |
| ПЗ46 Д* | 2.39 ± 0.15                  | 125 | 2.00 ± 0.34 | 97  | 2.12 ± 0.12 | 115 |
| F7 К    | 1.83 ± 0.16                  | 100 | 2.18 ± 0.21 | 100 | 1.90 ± 0.24 | 100 |
| F7 Д    | 2.15 ± 0.11                  | 117 | 1.66 ± 0.24 | 76  | 2.76 ± 0.18 | 145 |
| ЧК209 К | 1.76 ± 0.18                  | 100 | 2.71 ± 0.24 | 100 | -           | -   |
| ЧК209 Д | 2.16 ± 0.20                  | 122 | 1.33 ± 0.12 | 49  | -           | -   |
| ПБ02 К  | 1.96 ± 0.12                  | 100 | 1.96 ± 0.14 | 100 | -           | -   |
| ПБ02 Д  | 1.70 ± 0.24                  | 86  | 1.54 ± 0.25 | 79  | -           | -   |

\* К - контрольний варіант, Д - дослідний варіант;  
\*\* Чисельник - умови вирощування контрольного варіанту, знаменник - умови вирощування дослідного варіанту.

хоча середня величина цієї зміни виявляється статистично недостовірною. Як було показано вище, вміст в хлоропластах світлозбирального комплексу збільшується при зниженні рівня освітленості. В наших дослідках зміни вмісту СЗК2 оцінювались на хлорофільній основі. Проте, враховуючи відомий в літературі факт про існування корелятивного зв'язку між біосинтезом хлорофілу і апопротеїнів СЗК2, можна вважати, що вміст його п ліпептидів теж збільшується за даних умов. Тому можна припустити, що збільшення співвідношення 27kDa/25kDa відбувається за рахунок більш сильного збільшення 27 kDa поліпептиду. Найбільші зміни у співвідношенні основних поліпептидів СЗК2 були в лінії ПЗ46, для якої спостерігались найменші зміни вмісту хлорофілу та ПБК в хлоропластах.

Зниження рівня азотного живлення у всіх лініях без винятку викликає зменшення співвідношення 27kDa/25kDa поліпептидів (табл. 8). Враховуючи той факт, що дефіцит азоту викликає зниження СЗК2, можна припустити, що такі зміни відбуваються за рахунок того, що зменшення 27kDa поліпептиду сильніше за зменшення 25kDa поліпептиду. Всі лінії мають різну амплітуду зменшення цього співвідношення. Так, якщо в лінії ПЗ46 співвідношення основних поліпептидів СЗК2 майже не змінюється, то в лінії ЧК209 воно зменшується майже вдвічі, а лінії F7 та ПБ02, де ці зміни однакові, займають проміжне становище. Цікаво зауважити, що для лінії ЧК209 спостерігалось найменше зниження вмісту хлорофілу в листях і хлоропластах та вмісту СЗК2 в хлоропластах. Отже, можна відмітити, що менші за величиною зміни вмісту СЗК2 спостерігаються одночасно в найменшими варіаціями вмісту 25kDa поліпептиду. Аналогічна ситуація має місце і для лінії ПЗ46 при затінненні.

Співвідношення 27kDa/25kDa поліпептидів завнає збільшення при зниженні температури (табл.8), причому значно сильніше для лінії F7. Оскільки вміст всього СЗК2 в мембранах тилакоїдів знижується при зниженні температури, можна припустити, що зміна співвідношення поліпеп-

тидів відбувається за рахунок сильного зменшення поліпептиду 25 kDa, що добре узгоджується з вимірами параметрів індукції флуоресценції, які свідчать про зростання кількості ФСЗВ, яка не містить периферійного пулу СЗК, до якого належить цей поліпептид.

Таким чином, характер змін вмісту 25 і 27 kDa поліпептидів відрізняється для рівних стресів. Вміст 25 kDa поліпептиду змінюється слабше при зниженні освітленості і азотного живлення і сильніше при зниженні температури. Ці спостереження можуть означати, що вказані поліпептиди беруть участь в адаптаційних процесах фотосинтетичного апарату.

#### ВИСНОВКИ

1. Реакція фотосинтетичного апарату інбредних ліній кукурудзи на зниження рівня освітленості характеризується підвищенням вмісту в хлоропласті обох типів пігмент-білкових комплексів, які кодуються як хлоропластним, так і ядерним геномами.

2. Реакція фотосинтетичного апарату на дефіцит азотного живлення характеризується зниженням вмісту ПБК обох типів.

3. Реакція фотосинтетичного апарату на зниження температури характеризується зниженням вмісту ПБК обох типів.

4. Норма реакції на стрес кожного типу відрізняється для хлоропластного і ядерного геномів одного і того ж генотипу. Крім того, вона відмінна і для рівних генотипів.

5. Рівні типи стресів викликають неоднакові зміни рівних частин гетерогенного за складом комплексу СЗК2. Ці зміни відрізняються за характером для рівних генотипів.

#### Список наукових праць, що відображають основні положення дисертації

1. Порублева Л.В., Кочубей С.М. Вариации содержания хлорофилла в листьях и хлоропластах инбредных линий кукурузы в зависимости от условий выращивания // Физиология и биохимия культурных растений. -

1994. - 26, №5. - С.434-438.

2. Порублева Л.В., Жукова Я.Ф., Кочубей С.М. Влияние освещенности и азотного питания на содержание пигмент-белковых комплексов в хлоропластах инбредных линий кукурузы // Физиология и биохимия культурных растений. - 1994. - 26, №5. - С.438-443.

3. Порубльова Л.В., Кочубей С.М. Зміна вмісту пігмент-білкових комплексів в хлоропластах інбредних ліній кукурудзи в залежності від освітлення // Тези доповідей II з'їзду Українського товариства фізіологів рослин. Київ, 1993 р. - Київ, 1993. - Том 1, С. 52-53.

Porublyova L.V. Changes of pigment-protein complexes in mesophyll chloroplasts of inbred maize lines.

The thesis for a Candidate of Sciences (Biology) on the speciality 03.00.12 - plant physiology. Inst. of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 1994.

Content of pigment-protein complexes (PPC) in chloroplasts from mesophyll tissues were measured for four inbred maize lines: L346, F7, L502 and CHK209. Changes of PPC content induced by lower irradiance, nitrogen nutrition or temperature were revealed. The ratio changes of major polypeptides (25 and 27 kDa) of light-harvesting chlorophyll a/b complex (LHC II) were found as well. It was shown that the stresses induced content variations of both reaction center PPC and LHC II that were coded by chloroplast and nuclear genes respectively. It is found that the rate of gene reaction in response to stress was different for both types of genes and distinct for various genotypes. 25kDa polypeptide content changes slighter under lowering irradiance and nitrogen level but it changes stronger under temperature lowering. The slightest changes of 25kDa polypeptide content are observed for variants in which the slightest changes of whole LHC II pool took place. The latter observation permits to

suppose that 25 and 27 kDa polypeptides take part in adaptation of photosynthetic apparatus to environment conditions.

Порублёва Л.В. Именчивость пигмент-белковых комплексов хлоропластов мезофилла инбредных линий кукурузы.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.12 - физиология растений, Ин-т физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев, 1994.

Проведены измерения содержания пигмент-белковых комплексов в хлоропласте для мезофильных тканей четырёх инбредных линий кукурузы: ПЗ46, F7, ЧК209 и ПБ02. Выявлены изменения этой характеристики, а также соотношения основных полипептидов (25 и 27 kDa) свето-собирающего хл *a/b* комплекса (ССК2) при снижении освещённости, уровня азотного питания и температуры. Показано, что эти стрессы вызывают вариации содержания как ПБК реакционных центров, так и ССК2, т.е. мембранных ПБК обоих типов, кодируемых как хлоропластным, так и ядерным геномами. Установлено, что норма реакции на стресс различается для обоих геномов и, кроме того, оказывается различной для разных генотипов. Показано, что при затенении и азотном дефиците сильнее изменяется содержание полипептида 27kDa, а при понижении температуры - полипептида 25kDa. Наиболее слабые изменения содержания последнего наблюдаются для вариантов наиболее слабых вариаций пула ССК2 в целом, для линии ПЗ46 при затенении и линии F7 при дефиците азота. Такой характер изменений может свидетельствовать об участии этих полипептидов процессах адаптации фотосинтетического аппарата к условиям внешней среды.

Ключові слова:

хлоропласт, хлорофіл, пігмент-білкові комплекси, світлозбиральний комплекс, поліпептиди, стрес.

Робота фінансувалась в Державного фонду фундаментальних досліджень при ДКНТ України.

ЛНБ ім. В. Стефаника  
АН України

456380

АВ 31.736

**АВ 31.736**

---

Підписано до друку 11.01.95. Формат 60x84 1/16. Папір  
друк. Офсетний друк. Ум.друк.арк.0,93. Тираж 100прим. Зам.316.

---

ДВПД ДКНТ, 252171 Київ 171, вул. Горького, 180.