

А. И. Потопальский, В. А. Кацан, М. Е. Леськив

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ НАТИВНЫХ И МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НА БИОСИНТЕЗ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ У *NICOTIANA TABACUM* L.

1. СОДЕРЖАНИЕ ХЛОРОФИЛЛОВ И КАРОТИНОИДОВ У РАСТЕНИЙ ПЕРВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Исследовали влияние смеси э-ДНК рСАМVNEO, Ti-плазмиды и паслена солеустойчивого, а также нативных и алкилированных ДНК (ДНТ) из вышеназванных источников, использованных в отдельности, на уровень содержания хлорофиллов и каротиноидов в дозревающих листьях растений первого поколения сорта табака Крупнолистный 20. Показаны значительные изменения в биосинтезе и деградации хлорофиллов и каротиноидов, а также различный характер влияния смеси э-ДНК по сравнению с действием э-ДНК и э-ДНТ, использованных порознь. Общей закономерностью действия исследованных нуклеиновых кислот является значительное повышение уровня содержания хлорофиллов и увеличение соотношения зеленых и желтых пигментов в листьях зацветающих растений табака.

Введение. Действие э-ДНК на наследственный аппарат высших растений видоспецифично, зависит от доз используемых нуклеиновых кислот и условий проведения эксперимента, а также от физического состояния и влажности семян. Нативные ДНК растительного и животного происхождения могут вызывать у растений изменения на уровне хромосомы — появление хроматидных мостов в анафазе, двойных фрагментов, ацентрических колец [1—7]. Показан более высокий уровень хромосомных аберраций в митозе при воздействии ДНК животного происхождения по сравнению с ДНК из растений [1, 3]. Использование алкилированных тиофосфамидом ДНК и РНК (ДНТ и РНТ) в ряде случаев приводит к снижению частоты аберрантных хромосом и нормализации кариотипа [2, 3, 5], а также к снижению частоты видимых (в том числе хлорофилловых) мутаций [5, 7]. Несмотря на отсутствие крупных хромосомных поломок, ДНТ растительного происхождения оказывают сильное влияние на изменчивость признаков у растений [3]. Спектр изменений при этом может отличаться от такового, вызванного действием нативных ДНК [7]. ДНК и ДНТ прокариот не повреждают хромосомный аппарат растений и животных [1].

Использование э-ДНК дает возможность получать новые формы культурных растений, обладающие ценными хозяйственными признаками, которые могут служить основой для создания новых сортов [3, 6, 8—11].

При селекции табака одним из важных признаков, влияющих на качество урожая, является окраска листьев в период их созревания и ломки. Для получения сырья высокого качества помимо оптимального содержания белков, углеводов, никотина, карбонильных соединений необходимо быстрое разрушение хлорофиллов в дозревающих листьях или при их обработке после сбора урожая (вытамливании) [12, 13]. Однако ряд сортов, обладающих равномерной желтой окраской листьев, что соответствует требованиям стандарта высшего качества, имеет сниженное содержание органических соединений, низкую ма-

© А. И. ПОТОПАЛЬСКИЙ, В. А. КАЦАН, М. Е. ЛЕСЬКИВ, 1995

териальность, повышенную ломкость и др. недостатки [12]. Поскольку содержание фотосинтетических пигментов в листьях связано с рядом хозяйственно ценных признаков [12], мы поставили задачу исследовать влияние экзогенных нуклеиновых кислот на регуляцию биосинтеза фотосинтетических пигментов у желтолистного сорта табака Крупнолистный 20, разрушение хлорофиллов и пожелтение листьев у которого происходит на стадии выгона цветоносной стрелки задолго до цветения.

Материалы и методы. Семена линии одного из растений сорта Крупнолистный 20, автором которого является А. П. Гребенкин (Краснодар, НПО «Табак»), были любезно предоставлены Б. А. Левенко (Ин-т физиологии растений и генетики НАН Украины). Светло-желтая, почти белая, окраска зрелых листьев этого сорта табака обусловлена наличием пары доминантных генов и генов-модификаторов.

Для обработки семян применяли нативную и алкилированную ДНК плазмиды *pCAMVNEO*, содержащей ген устойчивости к канамицину из пятого бактериального транспозона *Tn5*, используемый в качестве маркера в генной инженерии растений, а также сильный растительный промотор из вируса мозаики цветной капусты [14, 15]. Препарат очищенной ДНК *pCAMVNEO* получен из Ин-та общ. генетики им. Н. И. Вавилова РАН (Москва). В опытах были использованы также выделенная в нашей лаборатории ДНК паслена солеустойчивого [16] и ДНК *Ti*-плазмиды [14]. Алкилирование ДНК тиофосфамидом осуществляли, как описано ранее [17], с некоторыми модификациями. Семена табака (по 300 шт. в каждом варианте) обрабатывали по методике, разработанной авторами статьи. Далее их промывали водой и высевали в автоклавированную почву (1,5 атм., 40 мин), семена пикировали. Растения выращивали в отдельных сосудах методом почвенной культуры в условиях вегетационной теплицы. Для исследования содержания хлорофиллов и каротиноидов брали высежки из крупных, хорошо сформированных листьев одинакового возраста из среднего яруса растений в момент зацветания центрального цветка, когда листья нижнего яруса уже имели ярко выраженные признаки деградации хлорофиллов.

Комплекс пигментов выделяли на холоду охлажденным ацетоном. Хлорофиллы *a* и *b*, а также смесь каротиноидов определяли спектрофотометрически, согласно общепринятым методам [18, 19]. Спектры поглощения регистрировали при помощи спектрофотометра Spexord UVVIS. Для расчета концентрации хлорофиллов в исследованных вытяжках пигментов использовали формулу Вернона [18], суммарного содержания каротиноидов — формулу Веттштейна [20]. Полученные данные подвергали тщательной статистической обработке. Содержание пигментов, а также все необходимые статистические показатели вычисляли, руководствуясь теоретическими предположениями [21, 22].

Величины содержания пигментов выражали в пересчете на грамм живой ткани, поскольку нами не были обнаружены существенные различия по содержанию сухого вещества между листьями опытных и контрольных растений ($21,57 \pm 1,05$ и $21,91 \pm 0,85$ % при $n=26$ и 19 соответственно).

Растения на протяжении периода вегетации проверяли на наличие основных групп вирусов иммунологическим методом [23], используя сыворотки против ВТМ, X-, Y-, M- и F-вирусов картофеля, любезно предоставленные Л. Ф. Диденко (Ин-т микробиологии и вирусологии НАН Украины). Инфицированные растения исключали из опыта.

Результаты и обсуждение. Особенности биосинтеза и деградации фотосинтетических пигментов у сорта табака Крупнолистный 20. Перед началом опыта был проведен анализ особенностей биосинтеза и деградации хлорофиллов и каротиноидов у сорта табака Крупнолистный 20 при выгоне цветоносной стрелки, образовании бутонов и зацветании. Исследовали растения

чистой линии, выращенные из семян, полученных от Б. А. Левенко (M_1), а также растения, полученные из семян растения № 9 этого поколения (M_2). Образцы для анализа пигментов брали из листьев одинакового возраста на стадии розетки, стрелкования, бутонизации и зацветания центрального цветка.

Было показано, что в начале выгона цветоносной стрелки (51-е сут после высадки рассады) в молодых листьях табака происходит статистически достоверное снижение содержания хлорофилла b ($p=0,99$, рис. 1, б), увеличение соотношения хлорофиллов a и b ($p>0,999$, рис. 1, д) и снижение соотношения зеленых и желтых пигментов ($p>0,99$, рис. 1, е). Намечается также тенденция к снижению содержания хлорофилла a (рис. 1, а).

К моменту образования бутонов (115-е сут вегетации) содержание хлорофиллов в молодых листьях снижается почти втрое ($p>0,999$,

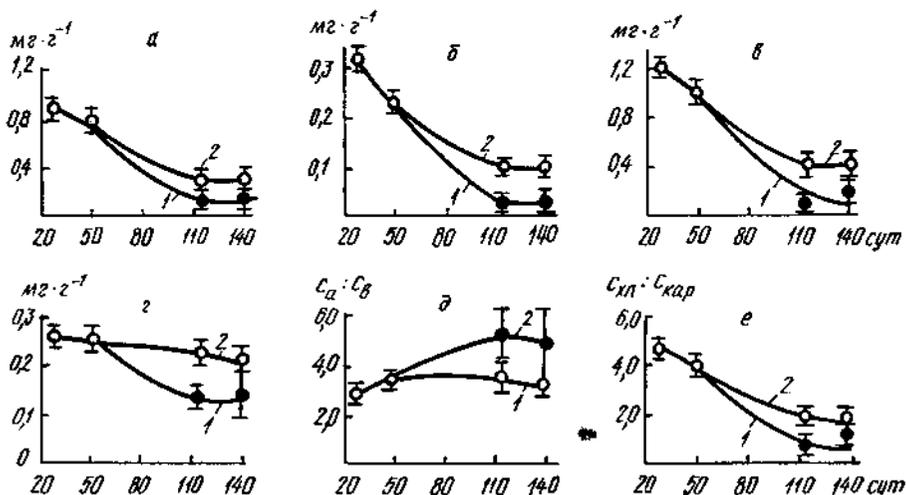


Рис. 1. Изменения содержания фотосинтетических пигментов в листьях табака Крупнолистный 20 на различных стадиях развития: розетки (28-е сут после высадки рассады), стрелкования (51-е сут), бутонизации (115-е сут), цветения (140-е сут). Данные приведены для: а — содержания хлорофилла a ; б — содержания хлорофилла b ; в — суммы хлорофиллов a и b ; г — суммы каротиноидов; д — соотношения хлорофиллов a и b ; е — соотношения зеленых и желтых пигментов (1 — созревающие листья; 2 — молодые листья). Семена чистой линии получены от Б. А. Левенко; $n=15$

рис. 1, а — в) и начинает снижаться содержание каротиноидов (рис. 1, г). Соотношение зеленых и желтых пигментов при вступлении растений в фазу бутонизации уменьшается в 2,5 раза ($p>0,999$, рис. 1, е). Соотношение содержания хлорофиллов a и b статистически достоверно ($p>0,999$) увеличивается на 15,5% в начале фазы стрелкования и в дальнейшем сохраняется на одном уровне (рис. 1, д). При зацветании растений (140-е сут) не наблюдалось дальнейших изменений в содержании фотосинтетических пигментов в молодых листьях табака (рис. 1, а — е).

В созревающих листьях среднего яруса растений, уже начинающих светлеть, но еще имеющих равномерную (без пятен) окраску, содержание хлорофиллов к началу бутонизации снижается почти на порядок, каротиноидов — вдвое ($p>0,999$, рис. 1, а — г). Снижение содержания хлорофилла b идет быстрее, чем хлорофилла a , в результате чего к началу бутонизации почти вдвое увеличивается соотношение $C_a:C_b$ ($p>0,999$, рис. 1, д). Соотношение зеленых и желтых пигментов уменьшается шестикратно ($p>0,999$, рис. 1, е). При зацветании растений содержание хлорофиллов и каротиноидов, а также соотношение основных групп пигментов в созревающих листьях находятся на уровне, характерном также для стадии бутонизации (рис. 1, а — е).

Следовательно, в процессе выгона цветоносной стрелки для сорта табака Крупнолистный 20 свойственно значительное снижение содержания хлорофиллов и соотношения зеленых и желтых пигментов не только в листьях созревающих ярусов, но и в молодых (растущих) листьях из верхушки растений. Эти данные свидетельствуют о существенных изменениях в регуляции биосинтеза и деградации фотосинтетических пигментов при переходе растений к стадии стрелкования и образования бутонов.

Следует отметить также гетерогенность выборки растений табака сорта Крупнолистный 20 по скорости деградации пигментов в процессе выгона цветоносной стрелки, бутонизации и зацветания. Визуально это проявляется в различной степени посветления листьев. Размах вариации исследованных параметров между отдельными растениями, вернее, их группами возрастает в процессе выгона цветоносной стрелки и зацветания (табл. 1). Такая гетерогенность, по всей вероятности, носит фенотипическую природу, поскольку работа проводилась с чистой линией табака, и при двухкратном повторении исследований динамики содержания пигментов для поколения M_2 (семена получены от растения № 9 из M_1 ; соцветие перед зацветанием изолировали пергаментным

Таблица 1

Величины коэффициентов вариации ($C = (\sigma/M) \cdot 100\%$) для содержания фотосинтетических пигментов в листьях табака Крупнолистный 20 на различных стадиях развития

Параметр	Продолжительность вегетации, сут			
	28*	51**	115***	124—141****
C_a	17,80	(с) 30,89	(в) 14,67 (с) 61,78	(в) 29,46 (с) 99,53
C_b	23,82	(с) 31,89	(в) 35,23 (с) 85,23	(в) 39,73 (с) 100,00
$C_{(a+b)}$	18,57	(с) 30,82	(в) 14,83 (с) 66,37	(в) 14,86 (с) 78,39
$C_{кар}$	24,51	(с) 22,86	(в) 19,47 (с) 13,41	(в) 20,97 (с) 51,10
$C_a : C_b$	1,34	(с) 10,64	(в) 28,60 (с) 41,11	(в) 13,36 (с) 55,89
$C_{(a+b)} : C_{кар}$	10,85	(с) 11,67	(в) 32,91 (с) 47,81	(в) 11,88 (с) 33,65

Примечание. (в) — молодые листья верхнего яруса; (с) — созревающие листья среднего яруса растений; $n=15$. * Розетка; ** стрелкование; *** бутонизация; **** цветение.

Таблица 2

Влияние ϵ -ДНК и ϵ -ДНТ различного происхождения на всхожесть семян и сроки появления всходов сорта табака Крупнолистный 20

Вариант опыта	Время от посева семян до появления всходов, сут	Всхожесть семян, %
1. Смесь ϵ -ДНК паслена, Ti -плазмиды и $pCAMVNEO$	36—42	31,67
2. ϵ -ДНК $pCAMVNEO$	90	2,67
3. ϵ -ДНТ $pCAMVNEO$	90	0,33
4. ϵ -ДНТ паслена солеустойчивого	60—66	46,67
5. ϵ -ДНТ Ti -плазмиды	90	4,0
6. Контроль (H_2O)	11—25	97,33

изолятором) обнаруженные для M_1 закономерности полностью подтвердились.

Для анализа влияния э-ДНК и э-ДНТ на биосинтез и деградацию фотосинтетических пигментов нами была избрана фаза зацветания, поскольку уровень содержания хлорофиллов и каротиноидов снижается до фазы бутонизации как в молодых, так и в созревающих листьях и сохраняется на таком же уровне до зацветания растений. Созревающие листья среднего яруса представляют наибольший интерес для практического использования, в связи с чем именно в них определяли содержание хлорофиллов и каротиноидов.

Влияние э-ДНК и э-ДНТ на уровень содержания фотосинтетических пигментов в листьях зацветающих растений первого поколения. Обработка семян табака смесью ДНК *pCAMVNEO*, *Ti*-плазмиды и паслена солеустойчивого (вариант 1), а также нативной (2) и алкилированной (3) ДНК *pCAMVNEO*, алкилированной ДНК паслена солеустойчивого (4) и *Ti*-плазмиды (5), использованными в отдельности, оказала большое влияние как на всхожесть семян, так и на сроки появления всходов (табл. 2).

Данные об уровне содержания хлорофиллов *a* и *b*, каротиноидов, а также соотношения основных групп пигментов ($C_a : C_b$; $C_{(a+b)} : C_{кар}$) представлены в табл. 3.

В пределах варианта 1 (на семена воздействовали смесью ДНК) наблюдалась значительная вариация по содержанию хлорофиллов и каротиноидов, которая проявлялась также визуальном в градации окраски листьев отдельных групп растений от бледно-салатного до зеленых тонов. Такая гетерогенность, возможно, обусловлена более сложным характером воздействия на многоклеточный организм зародышевой растений табака смеси ДНК плазмид и паслена по сравнению с действием ДНК и ДНТ, взятых порознь. Для выборок растений, где ДНК и ДНТ использовали в отдельности (варианты 2, 4 и 5), подобную гетерогенность не выявлено, размах вариации был значительно меньше, чем в контроле (табл. 4), и значительные визуальные различия по окраске листьев не наблюдались. В связи с существенным размахом вариации внутри выборок статистическая достоверность средних величин по содержанию хлорофиллов и каротиноидов для варианта 1 и контроля оказалась несколько ниже общепринятой: $0,90 < p < 0,95$; $0,80 < p < 0,90$ и даже $0,62 \leq p \leq 0,80$ (табл. 3). Большое разнообразие величин исследованных параметров можно сгруппировать в классы, руководствуясь формулой $r = 1 + 3,3 \lg n$, где r — количество классов; n — количество вариантов в выборке [21]. Для сравнения в классы были сгруппированы также растения варианта 4, где достоверность средних величин всех параметров была высокой ($p > 0,999$, табл. 3). Средние величины всех параметров, полученных для различных классов, статистически достоверны ($p > 0,95$ и выше, табл. 3).

Следует отметить, что для вариантов опыта, где использовали ДНК *pCAMVNEO* (2) и ДНТ *Ti*-плазмиды (5), из-за снижения всхожести семян получено немного растений ($n=8$ и 5 соответственно), а в случае ДНТ *pCAMVNEO* возшло только одно растение (табл. 3, № 73).

Нами обнаружены значительные отличия исследованных параметров между растениями опытных и контрольных вариантов. Для оценки достоверности различий между опытными и контрольными растениями, а также различными вариантами опыта мы использовали *t*-критерий Стьюдента, найденный по формуле, учитывающей величины M и m , вычисленные для анализируемых параметров по вариантам опыта и для контроля, и неодинаковую численность сравниваемых выборок растений [22].

При этом с высокой степенью достоверности (табл. 5) показано повышение уровня содержания хлорофиллов практически для всех вариантов опыта (1, 2, 4 и 5) в 1,6—2,6 раза по сравнению со средними

Таблица 3

Характеристика пигментных систем растений табака сорта Крупнолистный 20 (первое поколение после воздействия э-ДНК и э-ДНТ различного происхождения) на стадии зацветания ($M \pm m$)

Вариант опыта	мг·г ⁻¹								$C_a:C_b$	n	$C_{(a+b)}:C_{кар}$	n
	C_a	n	C_b	n	$C_{(a+b)}$	n	$C_{кар}$	n				
1. Смесь э-ДНК пас- лена солеустойчи- вого, Тi-плазмиды и рSAMVNEO	1. 0,3693±0,0123	14	0,1277±0,0049	11	0,4820±0,0173	13	0,0739±0,0030	4	2,39±0,05	8	4,13±0,11	4
	2. 0,6104±0,0124	9	0,1804±0,0070	6	0,8677±0,0271	8	0,1246±0,0089	4	2,63±0,02	11	4,87±0,05	6
	3. 0,8020±0,0179	7	0,2415±0,0080	7	1,1202±0,0177	5	0,1607±0,0064	6	2,82±0,02	15	5,33±0,07	5
	4. 1,0169±0,0084	5	0,3036±0,0049	6	1,3219±0,0251	5	0,2062±0,0055	6	3,22±0,06	5	6,04±0,14	8
	5. 1,1718±0,0180	4	0,3729±0,0099	5	1,5583±0,0394	4	0,2480±0,0083	8	—	—	—	—
	6. —	—	0,4119±0,0007	2	—	—	—	—	—	—	—	—
	7. —	—	0,4776±0,0009	2	—	—	—	—	—	—	—	—
M_0	0,6679±0,0452*	39	0,2472±0,0173*	39	0,9257±0,0674*	35	0,1778±0,0115*	28	2,73±0,04	39	5,25±0,15	23
2. э-ДНК рSAMVNEO	0,9384±0,0543*	8	0,2922±0,0109	7	1,2441±0,0727*	7	0,2431±0,0100	8	3,12±0,16***	8	5,15±0,33*	8
3. э-ДНТ рSAMVNEO	0,6776	1	0,2254	1	0,9030	1	0,1120	1	3,01	1	8,06	1
4. э-ДНТ паслена солеустойчивого	1. 0,8173±0,0140	5	0,2833±0,0061	6	1,1026±0,0172	5	0,2207±0,0028	4	2,60±0,02	6	4,57±0,09	3
	2. 0,9406±0,0086	6	0,3408±0,0041	5	1,2643±0,0109	5	0,2419±0,0026	7	2,79±0,01	7	4,92±0,07	6
	3. 1,0236±0,0137	4	0,3598±0,0062	5	1,3684±0,0159	5	0,2594±0,0062	5	2,94±0,2	5	5,27±0,6	4
	4. 1,1609±0,0339	6	0,4056±0,0085	3	1,4949±0,0105	4	0,2897±0,0062	4	—	—	5,74±0,12	6
	5. —	—	—	—	1,7377±0,0033	2	—	—	—	—	—	—
M_0	0,9900±0,0286	21	0,3378±0,0100	19	1,3396±0,0416	21	0,2516±0,0053	20	2,79±0,03	20	5,20±0,10	19
5. э-ДНТ Тi-плазми- ды	1,1179±0,0640*	5	0,3835±0,0398**	5	1,5015±0,0957*	5	0,2440±0,0219**	5	2,95±0,10	5	6,32±0,47**	5
6. Контроль (Н ₂ O)	1. 0,2719±0,0129	5	0,0665±0,0096	3	0,3679±0,0248	5	0,1600±0,0068	4	2,75±0,04	7	2,03±0,13	3
	2. 0,3731±0,0184	4	0,1021±0,0047	3	0,4935±0,0321	4	0,2013±0,0012	4	3,11±0,07	3	2,51±0,07	5
	3. 0,4898±0,0216	3	0,1483±0,0027	5	0,6575±0,0370	3	0,2232±0,0021	4	3,82±0,13	2	3,55±0,07	5
	4. 0,7279±0,0076	2	0,2464±0,0066	3	0,9785±0,0166	2	0,2923±0,0153	2	—	—	4,43±0,07	2
M_0	0,4303±0,0429**	15	0,1448±0,0164**	15	0,5732±0,0563**	15	0,2087±0,0116***	14	3,02±0,12	12	3,14±0,26**	12
M выборки в целом	0,7536±0,0317	89	0,2607±0,0114	86	1,0256±0,0448	85	0,2133±0,0062	76	2,84±0,03	85	4,97±0,14	68

величинами для контроля. В то же время содержание хлорофиллов в листьях растения № 73 (вариант 3) находилось в пределах вариации контроля (табл. 3). Выявлено также статистически достоверное повышение содержания каротиноидов при воздействии ϵ -ДНТ паслена и ϵ -ДНК *pSAMVNEO* и тенденцию к повышению при действии ϵ -ДНТ *Ti*-плазмиды (табл. 5). Содержание каротиноидов в листьях растения № 73 было вдвое ниже средней величины для контроля (табл. 3). Соотношение зеленых и желтых пигментов увеличивалось в 1,64—2,01 раза при $p > 0,999$ для всех вариантов опыта (табл. 3, 5).

Следовательно, значительное повышение содержания хлорофиллов и увеличение соотношения зеленых и желтых пигментов в первом поколении является общей закономерностью действия исследованных ϵ -ДНК и ϵ -ДНТ на семена растений желтолистного сорта табака Крупнолистный 20 в условиях проведения эксперимента.

При этом выявлены значительные отличия в действии на пигментный аппарат табака смеси ДНК паслена солеустойчивого, *pSAMVNEO* и *Ti*-плазмиды по сравнению с нативной ДНК *pSAMVNEO*, ДНТ паслена солеустойчивого и ДНТ *Ti*-плазмиды, использованными в отдельности. Так, наблюдалось более значительное повышение содержания хлорофилла *a* (на 40,5—67,4 %), суммы хлорофиллов (на 34,4—62,2 %) и общего содержания каротиноидов (на 36,7—41,5 %) при раздельном использовании ДНК и ДНТ плазмид и паслена. При воздействии ϵ -ДНТ паслена и смеси ϵ -ДНК из трех вышеупомянутых источников соотношение хлорофиллов *a* и *b* уменьшалось, в то время как ϵ -ДНК и ϵ -ДНТ

Таблица 4

Величины коэффициентов вариации для параметров, характеризующих уровень содержания основных фотосинтетических пигментов и их соотношения в листьях зацветающих растений табака сорта Крупнолистный 20 при воздействии ϵ -ДНК и ϵ -ДНТ различного происхождения

Вариант опыта*	C=(σ/M)-100 %					
	C_a	C_b	$C_{(a+b)}$	$C_{кар}$	$C_a : C_b$	$C_{(a+b)} : C_{кар}$
1	42,29	43,65	43,67	34,31	9,12	13,41
2	16,38	9,86	15,45	11,64	14,39	18,01
4	13,24	12,88	14,23	9,38	5,03	8,39
5	12,80	19,11	14,25	20,08	7,65	16,77
Контроль	38,67	43,85	38,05	20,79	13,45	28,25

* Расшифровку вариантов опыта см. табл. 2.

Таблица 5

Достоверность различий (p) по уровню содержания хлорофиллов и каротиноидов и соотношению основных групп пигментов между вариантами опыта и контролем (К), а также между разными вариантами опыта для сорта табака Крупнолистный 20 при воздействии ϵ -ДНК и ϵ -ДНТ различного происхождения

Вариант сравнения*	C_a	C_b	$C_{(a+b)}$	$C_{кар}$	$C_a : C_b$	$C_{(a+b)} : C_{кар}$
1—К	$p > 0,99$	$p > 0,999$	$p > 0,99$	$p < 0,90$	$p > 0,99$	$p > 0,999$
2—К	$p > 0,999$	$p > 0,999$	$p > 0,999$	$p > 0,95$	$p < 0,40$	$p > 0,999$
4—К	$p > 0,999$	$p > 0,999$	$p > 0,999$	$p > 0,99$	$p > 0,95$	$p > 0,999$
5—К	$p > 0,999$	$p > 0,999$	$p > 0,999$	$p < 0,90$	$p < 0,40$	$p > 0,999$
1—2	$p > 0,98$	$p < 0,90$	$p \approx 0,95$	$p > 0,99$	$p > 0,98$	$p < 0,40$
1—4	$p > 0,999$	$p < 0,90$	$p > 0,999$	$p > 0,999$	$p < 0,60$	$p > 0,40$
1—5	$p > 0,999$	$p > 0,99$	$p > 0,99$	$p > 0,98$	$p < 0,95$	$p > 0,99$
2—4	$p < 0,70$	$p > 0,98$	$p < 0,80$	$p < 0,90$	$p > 0,99$	$p < 0,30$
2—5	$p > 0,95$	$p > 0,98$	$p < 0,95$	$p < 0,10$	$p < 0,60$	$p < 0,95$
4—5	$p < 0,95$	$p < 0,90$	$p < 0,90$	$p < 0,40$	$p < 0,95$	$p > 0,99$

* Расшифровку вариантов опыта см. табл. 2.

ρ CAMVNEO и э-ДНТ *Ti*-плазмиды не влияли существенно на величину этого параметра. Алкилированные ДНК *Ti*-плазмиды и паслена солеустойчивого вызвали более значимое увеличение содержания хлорофилла *b* относительно действия э-ДНК ρ CAMVNEO (табл. 3, 5). В случае применения э-ДНТ *Ti*-плазмиды также наблюдалось более значительное возрастание соотношения хлорофиллов и каротиноидов (в 2,01 раза по сравнению с контролем), чем при использовании смеси ДНК ρ CAMVNEO и ДНТ паслена солеустойчивого (в 1,64—1,66 раза).

По характеру распределения исследованных параметров по классам можно судить о частоте встречаемости внутри выборок контроля и

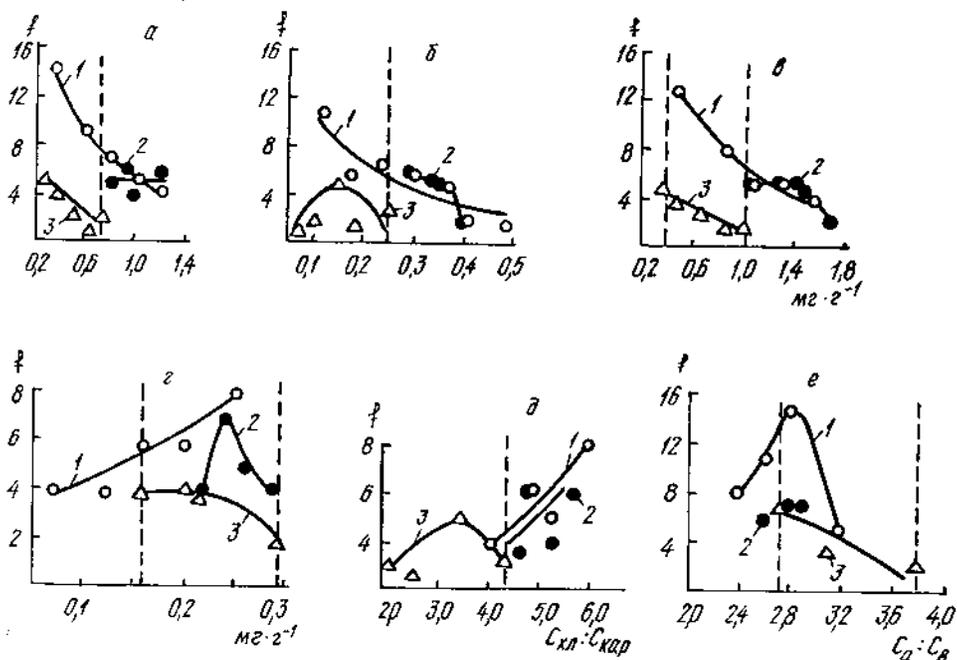


Рис. 2. Влияние смеси э-ДНК паслена солеустойчивого, ρ CAMVNEO и *Ti*-плазмиды (вариант 1), а также э-ДНТ паслена солеустойчивого, использованной в отдельности (вариант 4), на биосинтез фотосинтетических пигментов в листьях зацветающих растений табака сорта Крупнолистный 20: а — содержание хлорофилла *a*; б — содержание хлорофилла *b*; в — содержание хлорофиллов *a* и *b* (суммарное); г — суммарное содержание каротиноидов; д — соотношения содержания зеленых и желтых пигментов; е — соотношения содержания хлорофиллов *a* и *b*. Достоверность средних величин параметров по классам: $p > 0,95$ и $p > 0,98$ (1 — вариант 1; 2 — вариант 4; 3 — контроль). Границы вариации контроля показаны пунктирной линией

опытов фенотипов растений, отличающихся по содержанию хлорофиллов и каротиноидов и величинах соотношения основных групп пигментов (рис. 2). Содержание хлорофиллов для таких групп растений, полученных при использовании э-ДНТ паслена солеустойчивого, выше, чем для групп интактных растений (рис. 2, а — в и д). При использовании смеси э-ДНК превышение содержания хлорофилла *a* в 1,9—2,7 раза по сравнению со средним уровнем для контроля наблюдалось только у 41,03 % растений; хлорофилла *b* (в 2,10—3,30 раза) — у 38,46 %; суммы хлорофиллов *a* и *b* (в 1,96—2,72 раза) — у 40,00 % растений. Частоты фенотипов с повышенным содержанием хлорофилла при этом были выше таковых, где содержание хлорофиллов наблюдалось в пределах вариации контроля (рис. 2, а — в).

Величины содержания каротиноидов для фенотипов растений, полученных при воздействии э-ДНТ паслена солеустойчивого, не выходят за пределы вариации контроля, но при этом исчерпывают типы растений с пониженным содержанием каротиноидов и возрастает частота появления фенотипов с повышенным содержанием этих пигментов (рис. 2, г). При воздействии смеси э-ДНК характерно появление групп растений

со сниженным (в 1,67—2,3 раза) содержанием каротиноидов. Такие фенотипы составляют 28,57 % выборки (рис. 2, *г*).

Следует отметить также повышение величины соотношения содержания хлорофиллов и каротиноидов в 1,70—1,92 раза у 56,52 % растений при воздействии смеси э-ДНК плазмид и паслена. Частота фенотипов с увеличенным соотношением $C_{(a+b)} : C_{кар}$ при этом возрастает. При

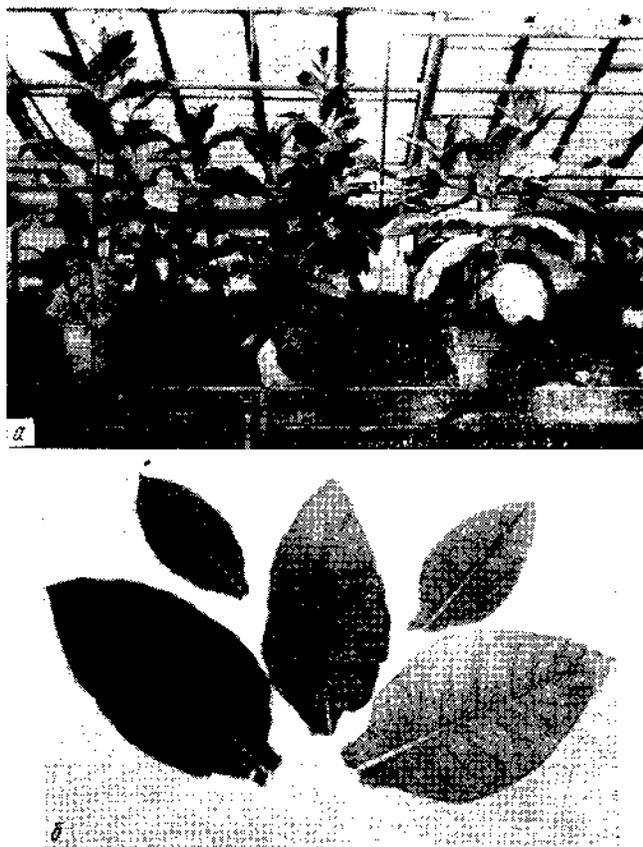


Рис. 3. Различия в регуляции биосинтеза и деградации хлорофиллов между опытными и контрольными растениями на стадии выгона цветоносной стрелки и зацветания (показано для растений M_2 : потомства растения № 73 — э-ДНТ *pCAMVNEO* и растения № 113 — э-ДНТ паслена солеустойчивого): *а* — группа контрольных и опытных растений: контроль светлее, справа; посредине и слева — ряды потомства растений № 113 и № 73 соответственно; *б* — листья верхнего и среднего ярусов опытного, № 113-4 (слева) и контрольного растения № 33 (справа) на стадии бутонизации, в центре показан лист из среднего яруса растения № 113-1 на стадии зацветания. Опытные растения зацветают раньше (см. рис. 3, *а*)

использовании э-ДНТ паслена солеустойчивого соотношение зеленых и желтых пигментов было выше контроля у 100 % растений (рис. 2, *д*).

При воздействии смеси э-ДНК и э-ДНТ паслена солеустойчивого, использованных порознь, характерно появление фенотипов растений, для которых $C_a : C_b$ ниже контроля, с одновременным исчезновением фенотипов с максимальными значениями этого параметра (рис. 2, *е*).

Однофакторная схема дисперсионного анализа с высокой степенью достоверности ($p > 0,99$) показала влияние данного метода воздействия э-ДНТ на все исследованные параметры: величины F значительно превышают их табличные значения для $p = 0,99$ (табл. 6). При этом в наибольшей степени изменяются содержание хлорофиллов и в особенности величина соотношения зеленых и желтых пигментов в листьях зацветающих растений первого поколения (M_1).

Эффект замедления разрушения хлорофиллов при созревании листьев растений табака, на которые воздействовали э-ДНК и э-ДНТ в данных условиях проведения эксперимента, сохраняется в M_2 (рис. 3, а, б).

По всей вероятности, использованные в работе э-ДНК и э-ДНТ влияют на экспрессию генов, обуславливающих раннее разрушение хлорофиллов в листьях табака сорта Крупнолистный 20. Одним из возможных путей такого влияния может быть реверсия гена (или генов), определяющего раннее пожелтение листьев, к «дикому» зеленому типу, но для подтверждения этой гипотезы требуются исследования тонких молекулярных механизмов влияния э-ДНК и э-ДНТ на генетический аппарат табака. Механизм действия э-ДНК на наследственность высших растений в настоящее время является предметом дискуссий [1, 3].

Выводы. Показаны значительные изменения в уровне содержания хлорофиллов и каротиноидов в листьях зацветающих растений первого поколения сорта табака Крупнолистный 20 при воздействии на семена ДНК *pSAMVNEO*, э-ДНТ паслена солеустойчивого и *Ti*-плазмиды, взятыми в отдельности, а также смеси нативных ДНК из трех вышеуказанных источников. При воздействии смеси э-ДНК плазмид и паслена наблюдалось появление фенотипов растений, отличающихся по содержанию хлорофиллов между собой в 1,4—3,7 раза, в то время как индивидуально использованные э-ДНК и э-ДНТ из тех же источников такого размаха вариации не вызывали. Общей закономерностью действия смеси э-ДНК, а также отдельно использованных э-ДНК *pSAMVNEO*, э-ДНТ паслена солеустойчивого и *Ti*-плазмиды является статистически достоверное повышение содержания хлорофиллов и увеличение соотношения хлорофиллов и каротиноидов в созревающих листьях зацветающих растений желтолистного сорта табака Крупнолистный 20. Это связано, возможно, с замедлением разрушения хлорофиллов при выгоке цветоносной стрелки. При воздействии э-ДНТ паслена солеустойчивого и э-ДНК *pSAMVNEO* отмечалось также статистически достоверное увеличение содержания каротиноидов.

Таблица 6

Результаты дисперсионного анализа данных о влиянии э-ДНК и э-ДНТ на содержание каротиноидов и хлорофиллов в листьях табака Крупнолистный 20 (для $p=0,99$)

Показатель	C_a	C_b	$C_{(a+b)}$	$C_{кар}$	$C_a : C_b$	$C_{(a+b)} : C_{кар}$
df_2	5	5	5	5	5	5
df_3	83	80	79	70	80	62
F фактическое	14,17	12,05	15,05	8,97	5,72	33,67
F табличное для $df_2=5$ и $df_3=60$	3,34	3,34	3,34	3,34	3,34	3,34

Примечание. df_2 — число степеней свободы при варьировании между вариантами; df_3 — внутри вариантов опыта; F — критерий достоверности различий [22].

Полученные данные свидетельствуют о возможности применения э-ДНК и э-ДНТ для изменения регуляции содержания хлорофиллов и каротиноидов у желтолистного сорта табака. Механизм такого влияния э-ДНК и э-ДНТ на генетический аппарат растений в настоящее время неизвестен и требует дальнейших исследований.

От всех проанализированных растений нами были получены семена, что дало возможность изучить характер наследования обнаруженных изменений в биосинтезе и деградации фотосинтетических пигментов в M_2 и M_3 . Эти данные будут приведены в нашей следующей работе.

ВПЛИВ ЕКЗОГЕННИХ НАТИВНИХ
ТА МОДИФІКОВАНИХ НУКЛЕІНОВИХ КИСЛОТ НА БІОСИНТЕЗ
ФОТОСИНТЕТИЧНИХ ПІГМЕНТІВ У NICOTIANA TABACUM L.

1. ВМІСТ ХЛОРОФІЛІВ ТА КАРОТИНОІДІВ У РОСЛИН
ПЕРШОГО ПОКОЛІННЯ

Резюме

Вивчали вплив суміші нативних е-ДНК пасльону солестійкого, Ti-плазмід та рСAMVNEO, а також нативних та алкілованих ДНК (ДНТ) із вищезазначених джерел на біосинтез хлорофілів і каротиноїдів у жовтолистяного сорту тютюну Крупнолистий 20. Препаратами е-ДНК і е-ДНТ діяли на насіння.

Виявлено, що загальною закономірністю дії досліджених е-ДНК є підвищення вмісту хлорофілів та збільшення співвідношення зелених і жовтих пігментів у листі рослини першого покоління, що починають цвісти.

A. I. Potopalsky, V. A. Katsan, M. E. Lesjkiw

EFFECT OF NATIVE AND MODIFICATED e-DNA ON BIOSYNTHESIS
OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS IN NICOTIANA TABACUM L.

1. CONTENT OF CHLOROPHYLLS AND CAROTENOIDES
IN THE PLANTS OF THE FIRST GENERATION

Summary

Effect of the native e-DNA from the salt-resistant solanum, Ti-plasmid and рСAMVNEO and also the native and alkylated DNA from the same origins have been studied on the biosynthesis of chlorophylls and carotenoides in the yellow-leaves tobacco cultivar Krupnolistny 20. e-DNA and e-DNT was acted on the seeds.

It has been shown that general action of the investigated e-DNA and e-DNT is increasing of the level of the chlorophylls content and growth of the ratio between green and yellow pigments in the leaves of the beginning to blossom plants of the first generation.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Картель Н. А. Эффекты экзогенных ДНК у высших растений.— Минск: Наука и техника, 1981.— 143 с.
2. Кунах В. А., Потопальский А. И., Ткачук З. Ю., Алпагова Л. К. Нормализация измененного карิโอотипа в популяциях культивируемых клеток гаплопеплуса под влиянием модифицированных РНК // Молекуляр. биология.— 1982.— 32.— С. 52—56.
3. Машталер С. Г., Юркевич Л. Н., Потопальский А. И. Цитогенетическое действие экзогенных ДНК на семена ржи различной плоидности // Генетика.— 1988.— 24, № 8.— С. 1419—1428.
4. Моргул В. В., Ткаченко Л. В., Ларченко В. А. Изучение мутагенной активности экзогенной ДНК на кукурузе // Молекуляр. биология (Київ).— 1982.— Вып. 32.— С. 76—80.
5. Моргул В. В., Ларченко Е. А., Ткаченко Л. В. и др. Сравнительное изучение мутагенной активности нативных и модифицированных ДНК на кукурузе // Цитология и генетика.— 1983.— 17, № 4.— С. 58—61.
6. Моргул В. В., Ларченко В. А. Мутагенная активность экзогенных ДНК и перспективность их применения в мутагенной селекции // Там же.— 1986.— 20, № 11.— С. 46—50.
7. Моргул В. В., Логвиненко В. Ф., Потопальский А. И., Баженова Т. М. Мутагенная активность экзогенных ДНК на озимой пшенице // Доп. АН УРСР. Б.— 1988.— № 8.— С. 71—73.
8. Потопальский А. И. Характеристика томатов «Украинский солеустойчивый», полученных с помощью модифицированной ДНК // Изд. рекомендации к использованию растит. ресурсов Черновицкой области.— Черновцы, 1984.— С. 13.
9. Потопальский А. И., Юркевич Л. Н., Машталер С. Г. Использование препаратов экзогенных нуклеиновых кислот в селекции озимой ржи на короткостебельность // Селекция и семеноводство.— 1992.— № 4, 5.— С. 5—8.
10. Главич Р. Д., Горюкина М. Н., Жидкова В. А. Влияние экзогенной ДНК на наследственность томатов // Там же.— 1985.— № 6.— С. 20—21.
11. Машталер С. Г., Потопальский А. И., Юркевич Л. Н. Использование экзогенных нуклеиновых кислот для получения селекционно-ценных форм злаков // Экол. генетика растений и животных: Тез. докл. III Всесоюз. конф.— Кишинев: Штиинца, 1987.— С. 74.

12. Баранова Е. Г. Генетические особенности наследования признаков химического состава сортов табака и использование их в селекции: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.—Эчмиадзин, 1990.—25 с.
13. Бурлакина А. В., Дьячкин И. И. Объективное определение качества табачного сырья // Сб. науч.-исслед. работ ВИТИМ.—Краснодар, 1977.—Вып. 166.—С. 106—111.
14. Пирузян Э. С. Основы генетической инженерии растений.—М.: Наука, 1988.—304 с.
15. Fromm M. E., Taylor L. P., Valbot V. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation // Nature.—1986.—319.—P. 791—793.
16. Пацковский Ю. В., Гайдук В. В., Веселовский О. В. и др. Обнаружение *PU19*-гомологических повторяющихся последовательностей в геноме некоторых видов высших растений // Биополимеры и клетка.—1992.—8, № 3.—С. 23—28.
17. Волощук Т. П., Пацковский Ю. В., Погопальский А. И. Алкилирование компонентов нуклеиновых кислот производными этиленмина // Биоорг. химия.—1990.—16, № 7.—С. 981—990; 1993.—19, № 4.—С. 484—494; 19, № 5.—С. 562—569.
18. Евстегнеев В. Б., Прохорова Л. И. Об определении хлорофиллов *a* и *b* в смеси без разделения компонентов // Биохимия.—1968.—33, № 2.—С. 286—295.
19. Шлык А. А. О спектрофотометрическом определении хлорофиллов *a* и *b* // Там же.—С. 275—285.
20. D. von Weltstein. Chlorophyll-letale und der submicroscopische forwechsel der plastiden // Exp. Cell. Res.—1957.—12.—S. 427—506.
21. Плохинский Н. А. Биометрия.—М.: Изд-во МГУ, 1970.—367 с.
22. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика.—Минск: Высшая шк., 1967.—328 с.
23. Дунин М. С., Попова Н. Н. Капельный метод диагностики вирусов в растениеводстве.—М.: Сельхозиздат, 1937.—47 с.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
НАН Украины, Киев

Получено 14.10.94