

Влияние экзогенных нативных и модифицированных ДНК на биосинтез фотосинтетических пигментов у *Nicotiana tabacum* L. 2. Динамика содержания хлорофиллов и каротиноидов у растений второго и третьего поколений

В. А. Кацан, А. И. Потопальский

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

Исследовали содержание хлорофиллов и каротиноидов в листьях растений табака сорта Крупнолистный 20 на различных стадиях развития для поколений T₂ и T₃ после воздействия препаратов нативных и алкилированных тиофосфамидом ДНК различного происхождения. Показано наследование раннецветущего фенотипа в T₂ и T₃ при высоком содержании хлорофиллов в созревающих листьях на стадии зацветания. Между контрольными и опытными растениями выявлены также различия по содержанию хлорофиллов и каротиноидов на более ранних стадиях развития.

Введение. Ранее нами была показана задержка времени старения листьев и ускорение зацветания в результате воздействия препаратов экзогенных нативных и алкилированных тиофосфамидом ДНК (э-ДНК и э-ДНТ) различного происхождения на семена табака сорта Крупнолистный 20 [1].

Для монокарпических растений процесс старения соматических тканей является ключевым моментом развития и прямо или опосредованно связан с переходом к генеративному развитию [2, 3]. Известно, что старение является высокоупорядоченным процессом, обусловленным генетической программой развития и сигналами из окружающей среды и находится под контролем ядра [3]. Синдром старения сопровождается индукцией экспрессии ряда генов. Сюда относятся различные деградационные ферменты, а также гены, необходимые для регуляции процессов дегградации биополимеров в стареющих тканях [2, 3]. Хотя механизмы индукции и регуляции процессов старения тканей расте-

ний во многом неясны, в настоящее время известны белки, которые могут служить маркерами его начала. Такими белками являются, например, цистеиновые протеиназы, металлотионеинподобные белки [2, 3]. Наиболее широко используемым биомаркером синдрома старения является быстрая потеря хлорофилла, связанная с деструкцией внутренних структур хлоропластов, поскольку для большинства растений индукция старения непосредственно связана не с переходом к генеративному развитию, а с возрастным снижением фотосинтетической функции [3]. Процессы, связанные со старением фотосинтетических тканей, достаточно хорошо изучены для многих растений [3].

В целом для реализации программы развития растений и в частности такого ее этапа, как старение, важную роль играют свет и гормоны [3—11]. В настоящее время неизвестно, действуют ли свет и гормоны независимо или растительные гормоны являются элементом сигнальных путей, которые инициируются физиологически активными фоторецепторами [3]. Достаточно хорошо изучена роль

цитокининов в процессах развития листьев, дифференциации хлоропластов, а также в предотвращении старения листьев [3, 5]. Старение листьев можно замедлить путем переноса гена изопентилтрансферазы, ключевого фермента биосинтеза цитокининов [6, 7]. Абсцизовая кислота, как известно, замедляет пластидогенез и ускоряет процессы старения хлоропластов [8, 9]. Ускоряют старение листьев также этилен и метилжасмонат [10]. Известно также о влиянии уровня экспрессии фитохромных генов на биосинтез хлорофиллов и продолжительность жизни фотосинтетических тканей [11].

Для растений с коррелятивной связью между переходом к цветению и индукцией старения тканей задержку старения листьев можно вызвать просто обрыванием цветков или плодов (например, у сои и других бобовых [3]). Известны также случаи задержки старения листьев при действии стрессовых факторов: затенения, высокотемпературном стрессе, ингибирования синтеза белков [12].

Для многих растений, в том числе и для табака, известны мутанты с измененными сроками старения листьев. Считают, что такие мутации затрагивают один или большее количество генов [10, 12].

В обеспечение цветения растений вовлечена довольно сложно организованная генетическая система. Переход растений к генеративному развитию находится под контролем фотопериодической индукции и связан с изменением содержания всех пяти групп фитогормонов [13, 14]. Известно достаточно большое количество генов, мутации которых детерминируют как поздне-, так и раннецветущий фенотипы растений [13].

Сорт табака Крупнолистный 20 является желтолистным мутантом, для которого свойствен ранний синдром старения листьев, заключающийся в полном разрушении хлорофиллов во всех ярусах растений, кроме верхушки, в процессе выгона цветоносной стрелки, а также значительное замедление генеративного развития по сравнению с обычными зеленолистными сортами [1]. Окраска зрелых листьев у этого табака контролируется парой доминантных генов и генами-модификаторами [1]. Очевидно, при действии препаратов экзогенных ДНК (э-ДНК) произошла реверсия к дикому зеленолистному типу, что может свидетельствовать о возможности использования э-ДНК для коррекции измененной в результате первичной мутации программы развития растения.

В связи с этим представляет интерес исследование названных изменений в онтогенезе, а также

подробное изучение различных стадий развития потомков растений-трансформантов, что дало бы возможность выяснить механизмы действия наших препаратов. Цель данной работы — исследование содержания хлорофиллов и каротиноидов на различных стадиях развития растений-трансформантов во втором и третьем поколениях после воздействия препаратов э-ДНК.

Материалы и методы. Растения выращивали методом почвенной культуры в условиях теплицы и вегетоплощадки из семян отдельных растений T_1 , полученных под пергаментными изоляторами. Семена растений следующих поколений (T_2 , T_3) получали таким же образом. Как контроль использовали растения чистой линии исходного сорта Крупнолистный 20. В процессе роста все растения табака проверяли на наличие вирусов, выявленных в окружающей среде: ВТМ, а также X-, Y-, M-, S- и F-вирусов картофеля, иммунологическим методом [15]. Антисыворотки к вышеуказанным вирусам были любезно предоставлены В. Ф. Диденко (Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев). Инфицированные растения выбраковывали из опыта.

Содержание пигментов фотосинтеза исследовали на различных стадиях развития растений: розетки, начала выгона цветоносной стрелки, начала цветения (зацветание центрального цветка). На каждой стадии развития высечки ткани для определения пигментов брали из листьев одинакового возраста. Хлорофиллы и каротиноиды экстрагировали из ткани листьев охлажденным 80 %-м раствором ацетона. Спектры поглощения смеси пигментов регистрировали на спектрофотометре Spectord UV VIS (Германия). Содержание хлорофиллов *a*, *b* и суммы каротиноидов определяли по спектрам поглощения, используя общеизвестные формулы расчета [16, 17]; содержание хлорофиллов, каротины и основных групп ксантофиллов — определяли так же, дополнительно применяя метод двухмерной распределительной хроматографии на бумаге [18]. Для разделения пигментов использовали бумагу марки Ленинградская средняя и следующие системы растворителей: бензол : петролейный эфир (3 : 1), петролейный эфир : этанол (14 : 1). Вытяжки пигментов из ткани листьев получали смесью охлажденного этанола и ацетона (3 : 1). Пятна, соответствующие отдельным пигментам, вырезали, хлорофиллы *a* и *b* экстрагировали 100 %-м ацетоном, каротины — петролейным эфиром, ксантофиллы (неоксантин, виолаксантин, лютеин) — 96 %-м этанолом. Содержание пигментов определяли на основе их спектров поглощения, используя коэффициенты молярной экстинкции в вышеука-

занных растворителях [18]. Оптимальные количества вещества, наносимого на хроматограмму, подбирали экспериментально. В случае необходимости экстракты пигментов концентрировали на роторном испарителе.

Содержание сухих веществ в ткани листа определяли весовым методом [19].

Полученные данные обрабатывали статистически по программам, составленным для миниЭВМ «Электроника МК 61».

Результаты и обсуждение. Для исследований были избраны представляющие наибольший интерес растения из разных вариантов опыта в T_1 [1]: №№ 1, 5, 16, 35 (вариант 1, смесь э-ДНК паслена черного солеустойчивого, *pCAMVNEO*, *pTi8628*), № 74 (вариант 2, э-ДНК *pCAMVNEO*), № 73 (вариант 3, э-ДНТ *pCAMVNEO*), №№ 92, 113 (вариант 4, э-ДНТ паслена черного солеустойчивого), №№ 156, 160 (вариант 5, э-ДНТ *pTi8628*). Из них №№ 1—35 представляют различные фенотипы по содержанию хлорофиллов и каротиноидов; растение № 5 могло бы представлять интерес для селекционной работы (очень крупные листья, быстрое развитие, высокое содержание хлорофиллов до стадии зацветания). Растение № 73 — единственное из варианта 3 в T_1 . Из остальных вариантов опыта для исследований в T_2 были избраны наиболее продуктивные растения по размеру листьев и скорости развития.

Ранее нами сообщалось о более ранних сроках зацветания опытных растений табака сорта Крупнолистный 20, выращенных из семян, обработанных препаратами э-ДНК и э-ДНТ [1]. Следует

отметить также более ранние сроки зацветания всех исследованных растений в T_2 (табл. 1).

Динамика содержания фотосинтетических пигментов в листьях исходного сорта Крупнолистный 20 приведена в предыдущей работе [1]. Следует отметить, что для контрольной выборки ($n = 20$) на 51-е сут после высадки рассады посветление листьев нижних и средних ярусов наблюдалось у 41,7 % растений, а ко времени зацветания опыта — у 100 %. Учитывая разницу в сроках зацветания контрольных и опытных растений, как контроль для стадии зацветания использовали листья контрольных растений того же возраста — не цветущих, а выгоняющих цветоносную стрелку. У цветущих растений сорта Крупнолистный 20 все листья нижних и средних ярусов имеют бледно-желтую окраску (см. [1]). Данные о содержании хлорофиллов и каротиноидов для различных стадий развития растений T_2 представлены графически (рис. 1—4).

Для стадии розетки следует отметить более низкое содержание хлорофиллов *a* и *b* в листьях большинства опытных растений по сравнению с контрольными (на 19,3—47,7 и 29,4—52,9 % соответственно, $p < 0,99$ и $p < 0,999$). Исключение составляет потомство растения № 113 (э-ДНТ паслена черного солеустойчивого), где содержание хлорофиллов *a* и *b* варьирует в пределах контроля (рис. 1, 2, *a*). Для потомства растений №№ 156, 160 (э-ДНТ *pTi8628*) выявлено статистически достоверное снижение содержания хлорофилла *a* ($p = 0,98$) и тенденцию к снижению содержания хлорофилла *b* ($0,90 < p < 0,95$). Значительно ниже контроля было

Таблица 1

Начало цветения растений табака сорта Крупнолистный 20, поколения T_2 после воздействия препаратов э-ДНК и э-ДНТ

Потомство от растения, № (вариант опыта)	Количество растений	Вариант обработки семян (см. [1])	Начало цветения после высадки рассады, сут
1	4	1. Смесь э-ДНК <i>pCAMVNEO</i> , <i>pTi8628</i> и паслена черного солеустойчивого	71—74
5	12	То же	70—79
16	8	То же	71—100
35	8	То же	71—100
74	6	э-ДНК <i>pCAMVNEO</i>	71—100
73	6	э-ДНТ <i>pCAMVNEO</i>	71—74
92	10	э-ДНК паслена черного солеустойчивого	71—100
113	3	То же	71
160	7	э-ДНТ <i>pTi8628</i>	71—100
Контроль	8	H ₂ O	124—141

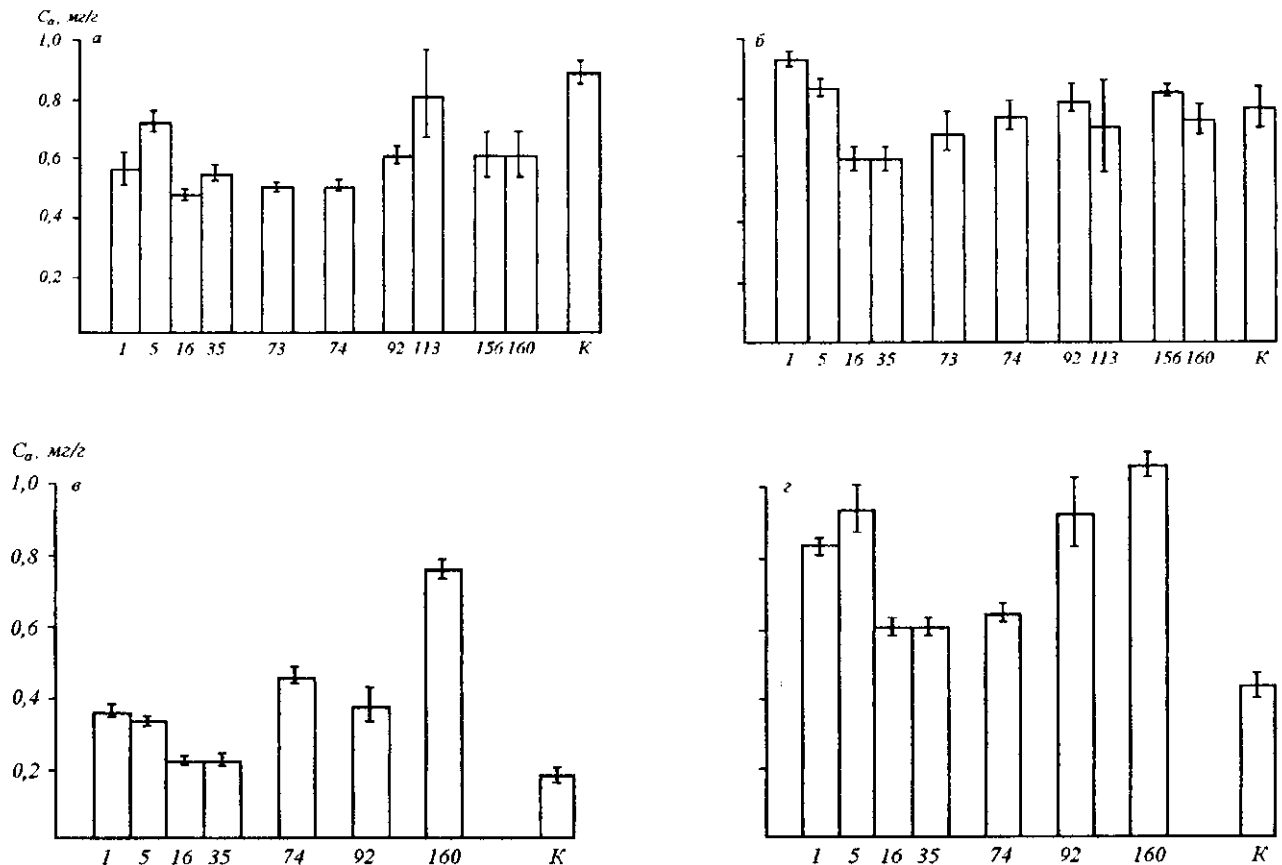


Рис. 1. Содержание хлорофилла a (C_a) в листьях растений табака сорта Крупнолистный 20 на различных стадиях развития поколения T_2 после воздействия препаратов э-ДНК и э-ДНТ: a — розетка (12 сут); $б$ — начало выгона цветоносной стрелки (29 сут); $в, г$ — начало цветения (см. табл. 1): $в$ — созревающие листья среднего яруса; $г$ — молодые листья из верхушек растений. Цифрами по оси абсцисс показаны номера растений из опыта в T_1 , из семян которых получены растения T_2 (варианты опыта в T_2). Количество исследованных потомков от каждого растения в T_2 (n) находится в пределах 12—21 для a и $б$; 6—12 — для $в$ и $г$. К — контроль

содержание суммы хлорофиллов в листьях потомства всех исследованных растений, кроме № 113 (рис. 3, a , $p < 0,95$ для вариантов 156, 160 и $p < 0,99$ — для остальных вариантов).

Отмечено также статистически достоверное ($p < 0,99$) увеличение доли хлорофилла b в листьях потомства всех исследованных растений на стадии розетки (табл. 2). При этом следует отметить, что в T_1 растения №№ 1, 5, 16, 35 и 113 относились к фенотипам с повышенной долей хлорофилла b [1].

Значительно выше контроля на стадии розетки было содержание суммы каротиноидов у потомков растений № 5 ($p < 0,999$) и №№ 92, 113 ($p < 0,95$

и $p < 0,999$) (рис. 4, a). Величина отношения хлорофиллов к каротиноидам оставалась на уровне контроля для всех вариантов опыта (табл. 3).

Для стадии выгона цветоносной стрелки статистически достоверное снижение содержания хлорофилла a по сравнению с контролем выявлено только для потомства растений №№ 16 и 35 (рис. 1, $б$). Содержание хлорофилла b в целом варьировало в пределах контроля (рис. 2, $б$), а статистически достоверное снижение суммы хлорофиллов наблюдалось только у потомства растения № 35 (рис. 2, $б$, $p < 0,95$). Статистически достоверное ($p < 0,99$) увеличение доли хлорофилла b на стадии выгона цветоносной стрелки обнаружено у потом-

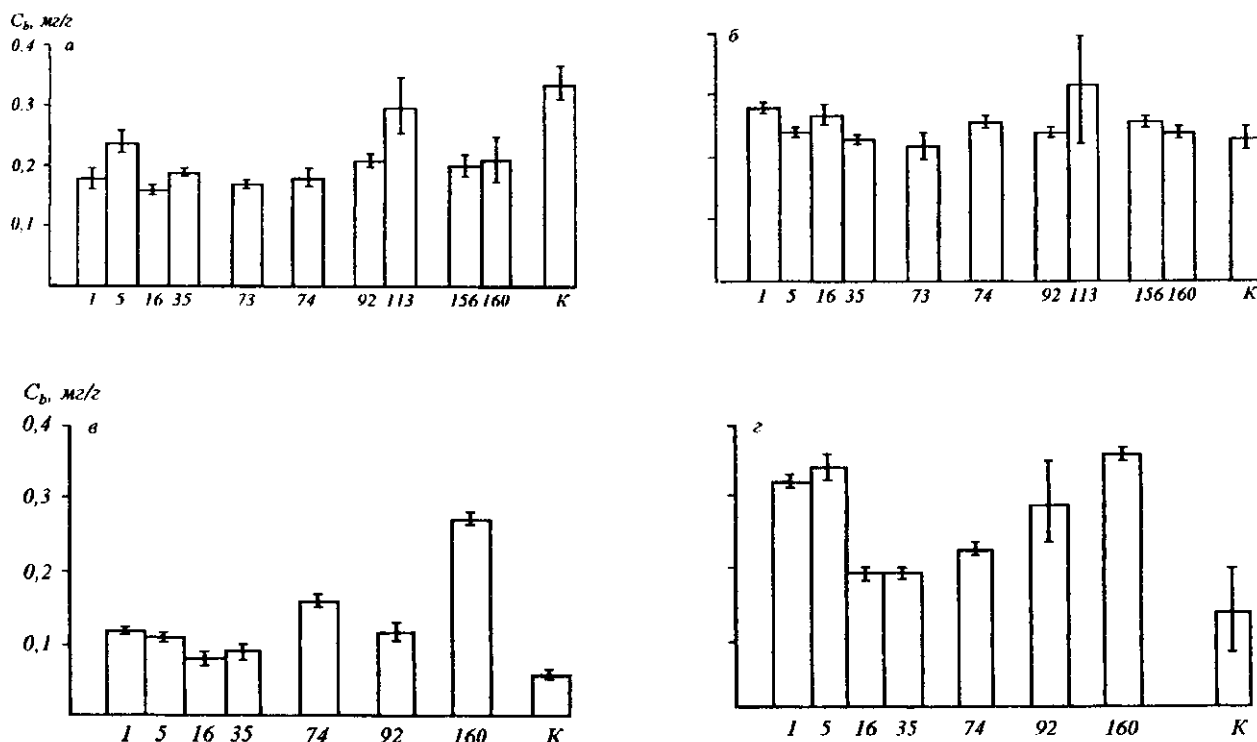


Рис. 2. Содержание хлорофилла *b* (C_b) в листьях растений табака сорта Крупнолистный 20 на различных стадиях развития поколения T_2 после воздействия препаратов э-ДНК и э-ДНТ. Обозначения см. в подписи к рис. 1

ства растений №№ 16, 35 и №№ 92, 113 (табл. 2). Для потомства растений №№ 1, 5 и 92 выявлено статистически достоверное увеличение содержания суммы каротиноидов ($p < 0,99$ и $p < 0,98$ соответственно, рис. 4, в). Статистически достоверное снижение отношения содержаний хлорофиллов и каротиноидов наблюдалось у большинства опытных растений, кроме вариантов 156, 160 и 113 (табл. 3).

Для стадии зацветания характерно более высокое содержание хлорофиллов *a* и *b* в созревающих листьях (из среднего яруса) опытных растений поколения T_2 по сравнению с контрольными (рис. 1, 2, в, $p < 0,999$). Исключение составляют варианты №№ 16 и 35, где содержание хлорофиллов практически не отличалось от контроля (рис. 1—3, в). Не отличалось от контроля также содержание хлорофиллов в молодых листьях (из верхушки растений) представителей этих же вариантов, а также у потомков растения № 74, в то время как для других вариантов опыта более высокое содер-

жание хлорофиллов выявлено также в молодых листьях (рис. 1—3, д).

Содержание каротиноидов на стадии зацветания превышало уровень контроля только в созревающих листьях потомков растения № 160 (рис. 4, в, $p < 0,99$). Следует отметить, что в T_1 наблюдалась тенденция к повышению содержания каротиноидов в варианте 5, к которому принадлежит растение № 160 [1]. Для опытных растений T_2 с повышенным содержанием хлорофиллов в молодых листьях (рис. 1—3, г) содержание каротиноидов было также выше контроля (рис. 4, г). В то же время для потомков растений №№ 16, 35 и 74, где содержание хлорофиллов в молодых листьях не превышало уровня контроля (рис. 1—3, г), общее содержание каротиноидов также находилось на уровне контроля как в молодых, так и в созревающих листьях (рис. 4, в, г).

Соотношение содержания хлорофиллов *a* и *b* для стадии зацветания не отличалось от контроля

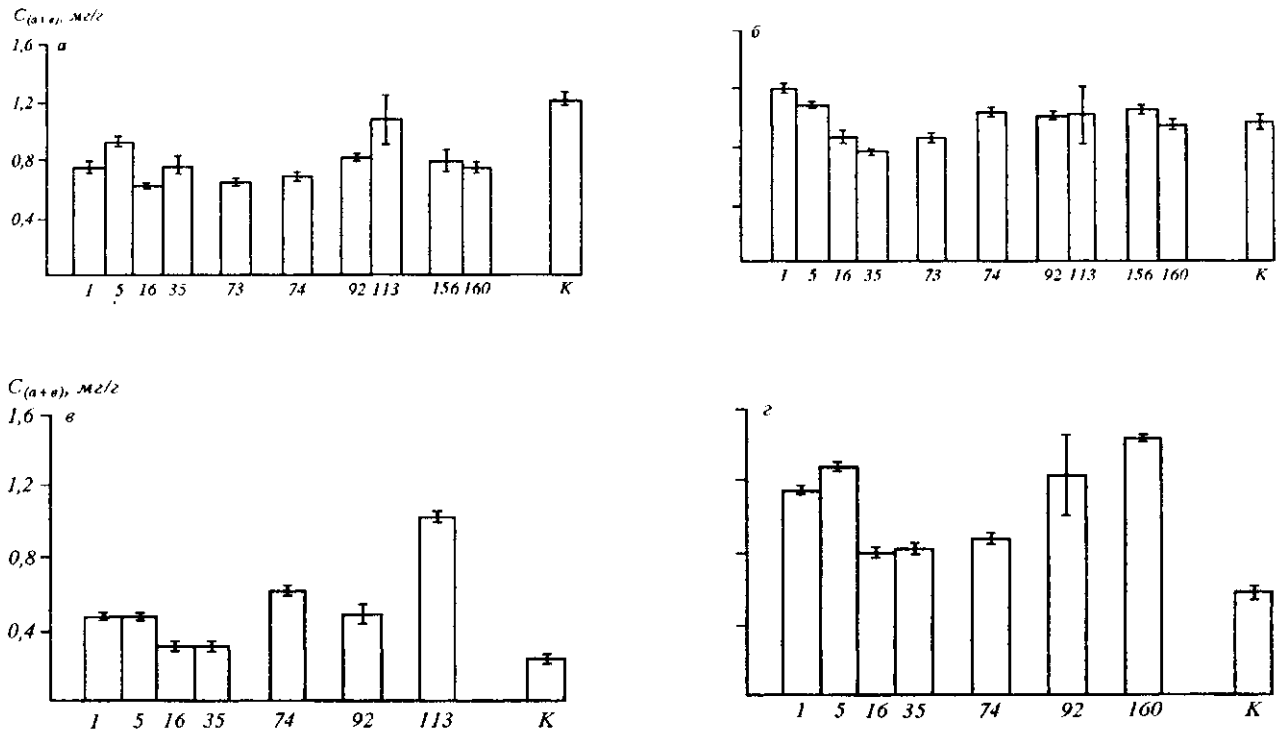


Рис. 3. Содержание суммы хлорофиллов *a* и *b* ($C_{(a+b)}$) в листьях растений табака сорта Крупнолистный 20 на различных стадиях развития поколения T_2 после воздействия препаратов э-ДНК и э-ДНТ. Обозначения см. в подписи к рис. 1

для молодых и для созревающих листьев исследованных растений (табл. 2).

Соотношение зеленых и желтых пигментов в созревающих листьях для большинства вариантов опыта в T_2 было выше контроля, за исключением варианта 16, где $C_{кл} : C_{кар}$ находилось в пределах вариации контроля (табл. 3). Для молодых листьев зацветающих растений выявлено статистически достоверное превышение контрольного уровня этого параметра у растений варианта № 5 (табл. 3, $p < 0,95$).

Содержание сухих веществ в ткани листьев на стадии розетки для большинства вариантов опыта в T_2 превышало уровень контроля, за исключением №№ 156, 160 (табл. 4; $p < 0,95$ — для №№ 5, 92; $p < 0,99$ — для №№ 1, 35, 74; $p < 0,999$ — для № 16). Для варианта 113 на стадии розетки выявлена тенденция к повышению содержания сухих веществ в ткани листьев ($0,90 > p > 0,95$).

На стадии выгона цветоносной стрелки содержание сухих веществ в ткани листьев превыша-

ло уровень контроля для всех вариантов опыта в T_2 , причем еще в большей степени, чем для стадии розетки (табл. 4).

На стадии зацветания содержание сухих веществ как в молодых, так и в созревающих листьях опытных растений выравнивалось с контролем (табл. 4). При этом в молодых листьях и контрольных, и опытных растений содержание сухих веществ было немного выше, чем в листьях из среднего яруса.

Следовательно, на стадии розетки, несмотря на более низкий уровень содержания хлорофиллов *a* и *b*, уровень содержания сухих веществ для большинства вариантов опыта в T_2 превышал контрольный (варианты 1, 5, 16, 35, 73, 74 и 92, рис. 1—3, а, табл. 4). Более высокое по сравнению с контролем содержание сухих веществ в этих же вариантах опыта наблюдалось на стадии выгона цветоносной стрелки при равном или несколько пониженном (для №№ 16, 35) содержании хлорофиллов (рис. 1—3, б, табл. 4). Для стадии зацветания характер-

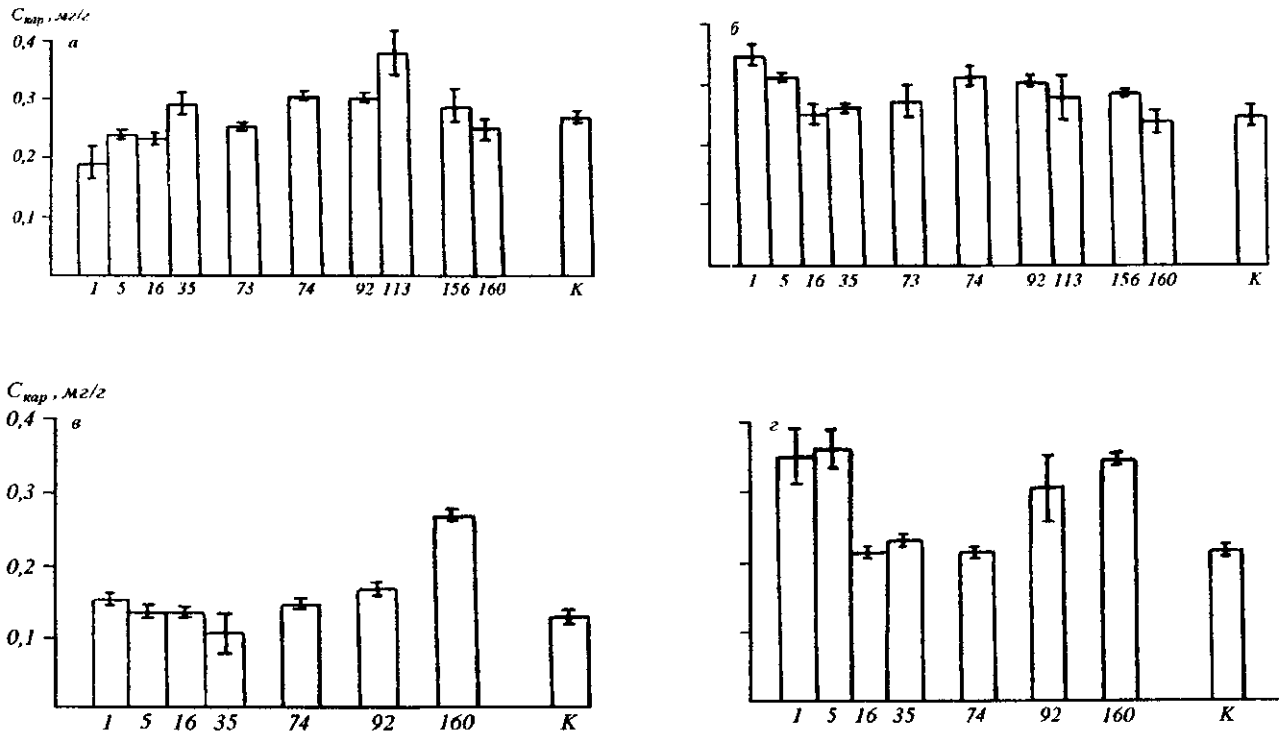


Рис. 4. Содержание суммы каротиноидов ($C_{кар}$) в листьях табака сорта Крупнолистный 20 на различных стадиях развития поколения T_2 после воздействия препаратов э-ДНК и э-ДНТ. Обозначения см. в подписи к рис. 1

но одинаковое содержание сухих веществ в листьях опытных и контрольных растений при более низких уровнях хлорофиллов в последних (рис. 1—3, г, д, табл. 4).

Для потомков растений № 5, 16, 35, а также № 92 выявлено расщепление на ряд фенотипов, значительно отличающихся по содержанию основных фотосинтетических пигментов уже на стадии розетки (табл. 5). Подобное расщепление на фенотипы наблюдалось также при зацветании растений в вариантах 1 и 4 опыта в T_1 [1].

На содержание основных фотосинтетических пигментов на стадиях выгона цветоносной стрелки и зацветания были исследованы в T_3 потомки растений 5-11, 35-34 и 73-2 поколения T_2 . Выявленные в T_2 закономерности по содержанию хлорофиллов и каротиноидов для всех вариантов опыта повторились в T_3 . Наблюдались также более ранние сроки зацветания (62—71 сут) и более высокий уровень содержания хлорофиллов в созревающих листьях зацветающих растений этих вариантов по сравнению с контролем.

Таким образом, для потомства исследованных растений-трансформантов показано наследование раннецветущего фенотипа при сохранении хлорофиллов в фотосинтетических тканях до завершения развития. При этом выявлены различия по содержанию хлорофиллов и каротиноидов между опытными и контрольными растениями не только на стадии зацветания, но и на более ранних стадиях развития. Отличительной особенностью всех исследованных растений-трансформантов является повышение доли хлорофилла *b* на стадии розетки, а также в молодых листьях ряда растений при выго-не цветоносной стрелки и зацветании. Следует отметить также различия по содержанию как хлорофиллов, так и каротиноидов между потомками индивидуальных растений, принадлежащих к различным вариантам опыта в T_1 . Заслуживает внимания более низкое содержание хлорофиллов по сравнению с контролем на стадии розетки в T_2 при более высоком содержании сухих веществ. Появление фенотипов растений с измененным содержанием каротиноидов в T_1 и T_2 также заслуживает

Таблица 2

Соотношение содержания хлорофиллов *a* и *b* ($C_a:C_b$) в листьях опытных и контрольных растений табака сорта Крупнолистный 20 на различных стадиях развития поколения T_2 после воздействия препаратов э-ДНК и э-ДНТ

Потомство от растения, №	Розетка, $M \pm m$	Стрелкование, $M \pm m$	Цветение	
			Средний ярус, $M \pm m$	Верхушка, $M \pm m$
1	3,29±0,08*	3,49±0,11	2,98±0,25	2,81±0,22
5	3,06±0,12*	3,10±0,06***	2,92±0,04	2,74±0,07
16	3,03±0,16*	2,89±0,12*	2,66±0,10	3,08±0,10
35	3,04±0,12*	2,81±0,06*	2,47±0,13	3,17±0,05
73	2,92±0,10*	3,12±0,28*	—	—
74	2,73±0,09*	3,02±0,08***	2,88±0,10	2,74±0,10
92	2,87±0,09*	2,87±0,06*	3,15±0,37	3,08±0,07
113	2,70±0,12*	2,22±0,17*	—	—
156	3,03±0,01*	3,14±0,10	—	—
160	2,73±0,46*	3,00±0,19*	2,73±0,09	2,93±0,10
Контроль	4,70±0,17	3,35±0,09	2,66±0,21	3,14±0,19

Здесь и в табл. 3, 4 отличия от контроля: * $p > 0,99$ и выше; ** $p > 0,95$; *** $0,90 < p > 0,95$; л — см. рис. 1.

Таблица 3

Соотношение зеленых и желтых пигментов ($C_{(a+b)} : C_{\text{хл}}$) в листьях опытных и контрольных растений табака сорта Крупнолистный 20 на различных стадиях развития поколения T_2 после воздействия препаратов э-ДНК и э-ДНТ

Потомство от растения, №	Розетка, $M \pm m$	Стрелкование, $M \pm m$	Цветение	
			Средний ярус, $M \pm m$	Верхушка, $M \pm m$
1	2,58±0,04	3,34±0,22**	3,23±0,17**	3,15±0,49
5	2,56±0,10	3,36±0,12*	3,25±0,35*	3,86±0,06**
16	2,76±0,10	2,96±0,08*	2,28±0,15	3,89±0,50
35	2,51±0,07	3,13±0,08	3,35±1,16***	3,39±0,01
73	2,57±0,16	3,24±0,28**	—	—
74	2,54±0,16	3,26±0,06*	2,88±0,10**	2,74±0,10
92	2,84±0,13	3,21±0,09*	3,12±0,26**	3,08±0,07
113	2,93±0,26	4,65±0,27***	—	—
156	3,35±0,43	3,89±0,10	—	—
160	3,15±0,55	3,71±0,21	2,73±0,10	2,93±0,11
Контроль	2,68±0,12	4,04±0,12	1,95±0,23	2,75±0,29

внимания, поскольку известно, что при различных стрессовых ситуациях изменяется соотношение между отдельными пигментами этой группы. Для выяснения возможных механизмов изменений в пигментном аппарате растений-трансформантов были проведены более детальные исследования пи-

гментного аппарата ряда растений с использованием хроматографического метода [18].

Для исследований были избраны потомки растений №№ 5, 35 и 73 (поколения T_2 и T_3) как представляющие наибольший интерес. Данные по содержанию хлорофиллов *a*, *b*, лютеина, виола-

Таблица 4

Содержание сухих веществ в листьях растений табака сорта Крупнолистный 20 на различных стадиях развития поколения T_2 после воздействия препаратов α -ДНК и α -ДНТ

Потомство от растения, №	Розетка, М±m	Стрелкование, М±m	Цветение	
			Средний ярус, М±m	Верхушка, М±m
1	18,32±2,30*	21,16±2,01*	26,51±2,49	26,35±3,31
5	17,54±1,12*	16,89±0,92**	20,56±2,11	25,99±1,34
16	19,95±0,95*	20,42±0,98*	17,25±0,80	27,05±0,82
35	18,41±1,28*	19,26±0,75*	20,65±0,19	24,15±4,06
73	18,93±1,94*	21,14±0,85*	—	—
74	18,19±0,99*	—	24,02±0,80	26,46±0,83
92	16,54±0,62**	—	23,53±2,27	24,54±0,97
113	18,87±4,92***	13,54±1,04	—	—
156	15,79±0,65	20,45±0,43*	—	—
160	10,69±0,48**	15,55±0,62	—	—
Контроль	14,54±0,55	13,43±0,86	20,89±1,48	24,09±1,21

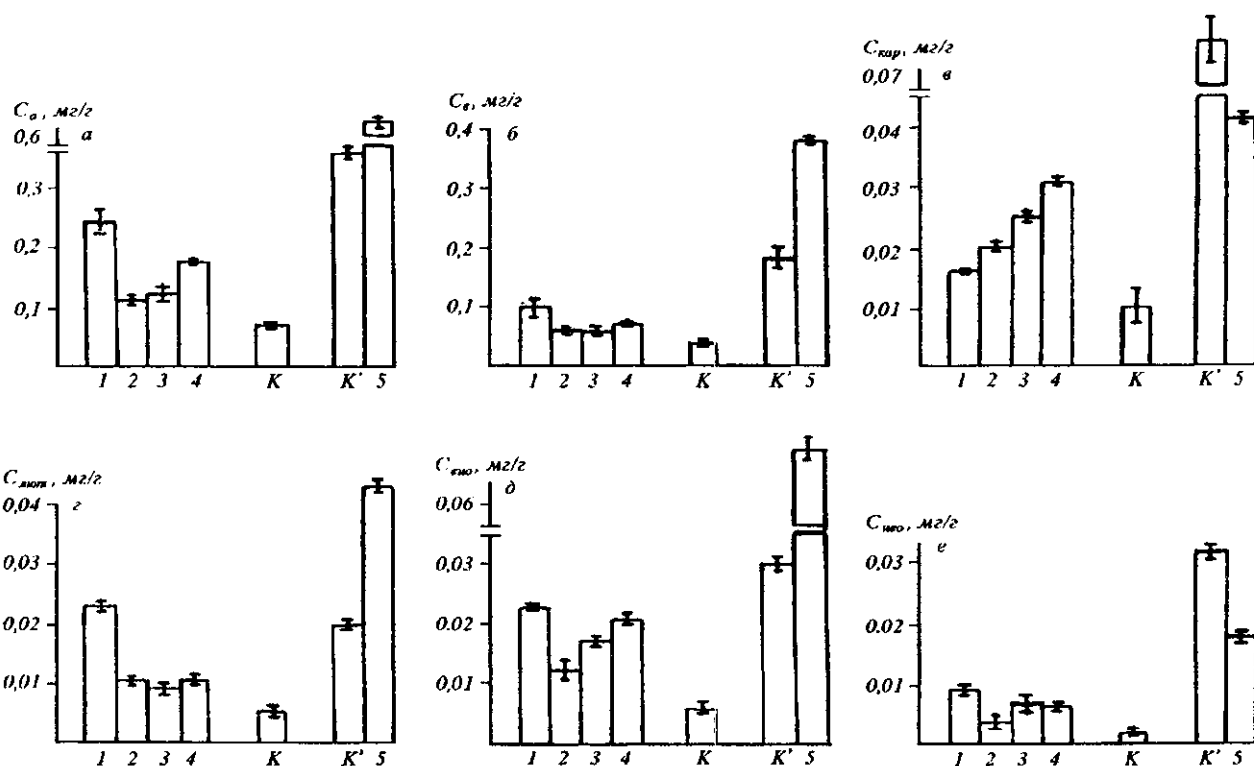


Рис. 5. Содержание основных групп фотосинтетических пигментов на стадии выгона цветonoсной стрелки (41 сут) для растений табака сорта Крупнолистный 20, поколений T_2 и T_3 после воздействия препаратов α -ДНК и α -ДНТ. Для разделения пигментов использован хроматографический метод [18]. Обозначения: а — для хлорофилла а; б — для хлорофилла б; в — каротина ($C_{кар}$); г — лютеина ($C_{лют}$); д — виолаксантина ($C_{вио}$); е — неоксантина ($C_{нео}$). 1—4 обозначены растения из поколений T_2 и T_3 : 1 — 5-11-1к; 2 — 35-34-1к; 3 — 73-2-1к; 4 — 73-1к (созревающие листья), 5 — молодые листья растения 5-11-1к; К и К' — контроль (созревающие и молодые листья соответственно)

Таблица 5

Появление фенотипов с различным содержанием хлорофиллов и каротиноидов у растений табака сорта Крупнолистный 20 на стадии розетки в поколении T₂ после воздействия препаратов э-ДНК и э-ДНТ

Потомство от растения, №	C _a , мг/г		C _b , мг/г		C _{кар} , мг/г	
	M±m	f, %	M±m	f, %	M±m	f, %
5						
M ₀	0,71±0,04	—	0,24±0,02	—	0,34±0,01	—
M ₁	0,20±0,01	7,14	0,17±0,01	38,46	0,28±0,01	23,08
M ₂	0,55±0,02	28,57	0,22±0,01	30,77	0,32±0,00	30,77
M ₃	0,67±0,02	35,70	0,30±0,00	15,38	0,35±0,01	23,08
M ₄	0,92±0,03	28,57	0,37±0,03	15,38	0,40±0,01	23,08
16						
M ₀	0,47±0,02	—	0,16±0,01	—	0,23±0,01	—
M ₁	0,33±0,01	28,57	0,10±0,01	33,33	0,15±0,01	14,20
M ₂	0,45±0,02	28,57	0,15±0,01	28,57	0,20±0,01	23,80
M ₃	0,54±0,01	28,57	0,19±0,01	19,05	0,24±0,01	38,09
M ₄	0,64±0,03	14,29	0,26±0,01	19,05	0,29±0,01	23,81
35						
M ₀	0,54±0,03	—	0,19±0,01	—	0,29±0,02	—
M ₁	0,31±0,06	11,11	0,11±0,01	23,53	0,19±0,01	27,78
M ₃	0,44±0,02	38,88	0,16±0,01	17,65	0,26±0,01	16,67
M ₃	0,62±0,01	33,33	0,20±0,01	29,41	0,33±0,01	44,44
M ₄	0,76±0,03	16,67	0,25±0,01	29,41	0,43±0,01	11,11
92						
M ₀	0,60±0,04	—	0,21±0,01	—	0,29±0,01	—
M ₁	0,38±0,01	21,43	0,13±0,01	21,42	0,24±0,01	35,71
M ₃	0,56±0,02	21,43	0,18±0,00	21,42	0,28±0,01	35,71
M ₃	0,65±0,02	28,57	0,24±0,01	35,71	0,34±0,00	14,29
M ₄	0,75±0,02	28,57	0,29±0,01	21,42	0,38±0,01	14,29
Контроль						
M ₀	0,88±0,05	—	0,34±0,03	—	0,26±0,01	—
M ₁	0,73±0,02	33,33	0,26±0,01	50,00	0,23±0,00	50,00
M ₃	0,87±0,02	33,33	0,34±0,02	25,00	0,27±0,01	33,33
M ₃	0,92±0,06	16,67	0,41±0,00	8,30	0,33±0,00	8,33
M ₄	1,17±0,00	16,67	0,52±0,02	16,67	0,37±0,00	8,33

Примечание. M₀ — средняя величина для варианта опыта в T₂; M₁—M₄ — средние величины по классам (различные фенотипы); f, % — частота встречаемости фенотипов; n = 12—21.

ксантина и неоксантина представлены на рис. 5. Содержание хлорофиллов *a* и *b* в созревающих листьях на стадии выгона цветоносной стрелки для всех исследованных растений было выше контроля (рис. 5, *a*, *б*). Доля хлорофилла *b* составляла величину, либо близкую к контролю, либо не-

сколько ниже ее (рис. 6, *a*). Следует отметить повышение доли хлорофилла *b* в молодых листьях растения из T₃ от № 5 (5-11-1к), а также в листьях из молодого побега цветущего растения № 5 из T₁ (рис. 6, *a*). Повышение доли хлорофилла *b* свойственно также для стадии розетки, начала выгона

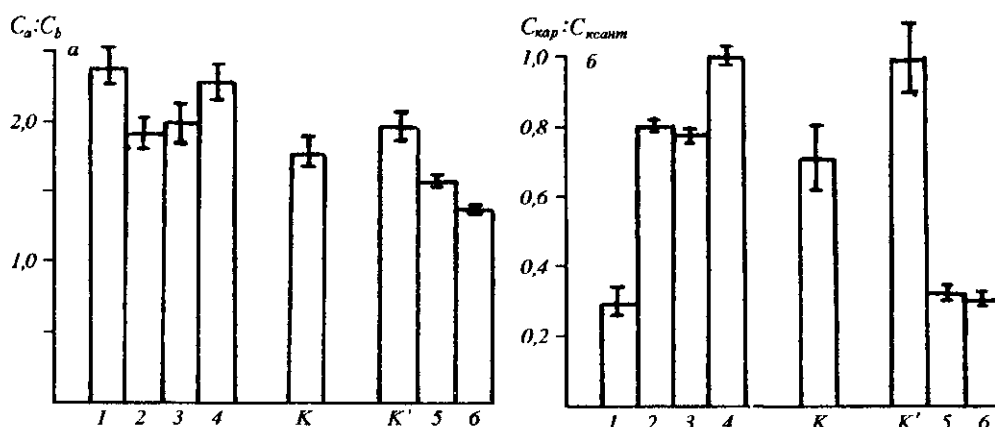


Рис. 6. Величина соотношения содержания хлорофиллов $C_a : C_b$ (а), а также между каротином и ксантофиллами ($C_{кар} : C_{ксант}$) (б) для стадии выгона цветоносной стрелки (41 сут) растений табака сорта Крупнолистный 20 поколений T₂ и T₃ после воздействия препаратов э-ДНК и э-ДНТ. Обозначения см. в подписи к рис. 5; 6 — молодые листья растения № 5

цветоносной стрелки и для молодых листьев на стадии зацветания растений из поколения T₂ от № 5 (табл. 2). В созревающих листьях растения № 5 доля хлорофилла *b* была близкой к контролю, то же наблюдалось и в растениях из T₂ (табл. 2) и несколько ниже контроля — в исследованном растении из T₃ (рис. 6, а). Очевидно, повышенная доля хлорофилла *b* характерна для молодых фотосинтетических тканей растения № 5 на всех стадиях развития, и это свойство наследуется в последующих поколениях (T₂ и T₃).

Избранные для исследования состава каротиноидов растения №№ 5, 35 и 73 принадлежат к различным фенотипам по содержанию каротиноидов на разных стадиях развития. Так, для поколения T₂ растения № 5 показано повышение содержания суммы каротиноидов в молодых листьях по сравнению с контролем (рис. 4, б, г), в то время как в созревающих листьях представителей поколений T₂ и T₁ содержание каротиноидов не превышало уровня контроля (рис. 4, в). Растение № 35 из T₁ по содержанию каротиноидов в созревающих листьях также представляет фенотип, близкий к контролю. На уровне контроля находилось и содержание каротиноидов как в молодых, так и в созревающих листьях на всех стадиях развития растений поколения T₂ от № 35 (рис. 4, а—г). Растение № 73 в T₁ отличалось особо низким содержанием каротиноидов в созревающих листьях [1]. В молодых листьях поколения T₂ этого растения содержание суммы каротиноидов было равным контролю (рис. 4, а, б), а для созревающих листьев на стадии зацветания в T₂ предварительными исследования-

ми было выявлено фенотипы как с пониженным, так и с повышенным содержанием каротиноидов.

Содержание всех групп каротиноидов, как и хлорофиллов, на стадии выгона цветоносной стрелки у всех исследованных растений было выше контроля (рис. 5). При этом следует отметить, что в созревающих листьях растения из поколения T₃ от № 5 наблюдалось пониженное содержание каротина по сравнению с потомками от растений №№ 35 и 73 и повышенное содержание виолаксантина, неоксантина и лютеина в особенности (рис. 5, в—е). Доля каротина в пуле каротиноидов созревающих листьев этого растения — самая низкая и сравнительно ниже контроля (рис. 6, б). Такая же картина выявлена и для молодых листьев растения из T₃ от № 5, а также для листьев из молодых побегов в T₁ (рис. 6, б). Следовательно, характерным признаком пигментного аппарата растения № 5 является значительное повышение доли ксантофиллов по сравнению с контролем как в молодых, так и в созревающих листьях и сохранение этого признака в следующих поколениях. Это может быть следствием мутации, обуславливающей повышенную экспрессию генов, регулирующих биосинтез ксантофиллов у этого растения.

Другая важная закономерность выявлена для растения № 73: в созревающих листьях растений № 73-1к (T₂) и 73-2-1к (T₃) на стадии выгона цветоносной стрелки виолаксантина было в 2 раза больше, чем лютеина, в то время как для других растений это отношение не превышало величину контроля и было равным или близким к 1 (рис. 5, г, д). Поскольку соотношение содержания каротина

и суммы ксантофиллов для T_2 и T_3 от № 73 не превышает величину контроля (рис. 6, б), в данном случае может иметь место мутация, связанная с регуляцией содержания виолаксантина в пуле каротиноидов. Последнее может иметь значение для выживания в экстремальных условиях освещения. При этом уменьшается доля лютеина как пигмента, менее важного для фотосинтеза у высших растений [20].

Подводя итог вышеизложенному следует отметить, что замедление разрушения хлорофиллов при переходе к генеративному развитию у табака сорта Крупнолистный 20, по-видимому, обусловлено мутацией, регулирующей тип развития растений и начало такого его этапа, как старение наиболее важных для растения фотосинтетических тканей. Это может быть мутация гена одного из фитогормонов или компонента пути трансдукции его сигналов. Известен ряд подобных мутаций генов, переключающих тип развития у арабидопсиса, которые были связаны также с задержкой старения листьев, изменением сроков зацветания, а также со значительными изменениями в пигментном аппарате растений-мутантов, в частности, по содержанию хлорофиллов и величине доли хлорофилла *b* [4—6, 11]. Более рано цветущий тип растений-трансформантов в наших опытах может быть следствием именно этой мутации, т. е. связан с обеспечением повышенного темпа генеративного развития при сохранении высокого содержания хлорофиллов до стадии зацветания.

Помимо наследования раннецветущего фенотипа и сохранения достаточного для быстрого зацветания уровня хлорофиллов в листьях выявлены также значительные изменения в содержании хлорофиллов и каротиноидов на стадиях розетки и выгона цветоносной стрелки для представителей различных вариантов опыта. Такие изменения могут быть обусловлены также серией других мутаций, связанных с регуляцией содержания хлорофиллов, каротина и ксантофиллов в фотосинтетических тканях растений-трансформантов.

В. А. Кацан, А. І. Потопальський

Вплив екзогенних нативних та модифікованих ДНК на біосинтез пігментів фотосинтезу у *Nicotiana tabacum* L. 2. Динаміка вмісту хлорофілів та каротиноїдів у листі рослин другого та третього покоління

Резюме

Показано успадкування ранньоквітучого фенотипу для рослин-трансформантів тютюну сорту Крупнолистний 20 у поколіннях T_2 та T_3 після дії препаратів нативних та алкілованих тіофосфамідом препаратів ДНК різного походження. У листі рослин-трансформантів, які зацвітають, збе-

рігався високий рівень вмісту хлорофілів також у T_2 та T_3 . Рівень вмісту хлорофілів у листі на ранніх стадіях розвитку рослин в усіх варіантах досліді був нижчим, ніж у вихідного сорту Крупнолистний 20, а вміст сухих речовин — вищим. Показано також збільшення частки хлорофілу *b* у листі всіх дослідних рослин поколінь T_2 та T_3 на ранніх стадіях розвитку і для деяких з них — у молодому листі протягом усього розвитку. Виявлено фенотипи рослин зі зміненими співвідношеннями між каротином та ксантофілами та між окремими ксантофілами при незмінному співвідношенні каротинів та ксантофілів.

V. F. Katsan, A. I. Potopalsky

Effect of exogenic native and modified DNAs on biosynthesis of photosynthetic pigments in *Nicotiana tabacum* L. 2. The dynamics of chlorophylls and carotenoids content in the plants of the second and third generations

Summary

The inheritance of the early-flowering type of development of the tobacco cultivar *Krupnolistnyy* 20 has been shown for the generations T_2 and T_3 after the treatment with preparations of native and alkylated by thiophosphamide DNA. The high level of chlorophylls content at the beginning of blossom has been also observed in T_2 and T_3 in the leaves of all experimental plants. The chlorophylls content in the leaves at the early stages of development is lower than in the untreated plants, but the content of dry substances is higher. The rising of the chlorophyll *b* portion has been shown at the early stages of the development for all investigated experimental plants and for some of them in young leaves during all the period of development. The phenotypes have been revealed with altered proportions between carotene and xanthophylls or between different xanthophylls.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Потопальський А. І., Кацан В. А., Леськів М. Е. Влияние экзогенных нативных и модифицированных нуклеиновых кислот на биосинтез фотосинтетических пигментов у *Nicotiana tabacum* L. 1. Содержание хлорофиллов и каротиноидов у растений первого поколения // Биополимеры и клетка.—1995.—11, № 2.—С. 88—99.
2. Buchanan-Wollaston V. Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. Identification of a gene encoding a senescence-specific metallothionein-like protein // *Plant Physiol.*—1994.—105, N 3.—P. 839—846.
3. Hensel L. L., Grbic V., Baumgarten D. A., Blecker A. B. Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis* // *The Plant Cell.*—1993.—5, N 5.—P. 553—564.
4. Chory J. A genetic model for light-regulated seedling development in *Arabidopsis* // *Development.*—1992.—115.—P. 337—354.
5. Chory J., Reinecke D., Sim S., Wasburn T., Brenner M. A role for cytokinins in deetiolation in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.*—1994.—104, N 2.—P. 339—347.
6. Catsky J., Pospffillovi J., Machackova J., Wilhelmova N., Sestak Z. Photosynthesis and water relations in transgenic tobacco plants with T-DNA carrying gene 4 for cytokinin synthesis // *Biol. Plant.*—1993.—35, N 3.—P. 393—399.
7. Smart S. M., Scofield S. R., Bevan M. V., Dyer T. A. Delayed leaf senescence in tobacco plants transformed with *tmr*, a gene for cytokinin production of *Agrobacterium* // *Annu. Rept., 1990/AFRC Inst. Plant Sci. Res.—Norwich, 1990.*—P. 30—32.

8. Кукина И. М., Микулович Т. П., Кулаева О. Н. Изменение синтеза хлоропластных белков и структура семядолей тыквы под влиянием абсцизовой кислоты // Физиология растений.—1995.—42, № 5.—С. 686—695.
9. Макеев А. В., Кузнецова В. В. Интенсивный и экстенсивный эффекты фитогормонов в развитии фотохимической активности хлоропластов // ДАН России.—1996.—346, № 11.—С. 116—118.
10. Oh S. A., Park J. H., Lee G. I., Park K. H., Park S. K., Nam H. G. Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* // The Plant J.—1997.—12, N 3.—P. 527—535.
11. Rousseaux M. C., Ballare C. L., Jordan E. T., Vierstra R. D. Directed overexpression of PHYA. A molecular tool to alter the tissue distribution of plant sensitivity to far-red radiation // Plant Physiol.—1996.—111, N 2.—P. 138.
12. Howard T., Smart C. M. Crops that stay green // Annu. Appl. Biol.—1993.—123, N 1.—P. 193—219.
13. Coupland G. Regulation of flowering time: *Arabidopsis* as a model system to study genes that promote or delay flowering // Phil. Trans. Roy. Soc. London B.—1995.—350, N 1331.—P. 27—34.
14. Ложникова В. Н., Комарова Э. Н., Дудка Н. Д., Выхребенцева Э. Н. Изменения лектиновой активности и некоторых фитогормонов в листьях табака в период фотопериодической индукции // ДАН России.—1995.—343, № 4.—С. 547—550.
15. Дунин М. С., Попова Н. Н. Капельный метод диагностики вирусов в растениеводстве.—М.: Сельхозиздат, 1937.—47 с.
16. Шлык А. А. О спектрофотометрическом определении хлорофиллов *a* и *b* // Биохимия.—1968.—33, № 2.—С. 275—235.
17. Von Wettstein D. Chlorophyll-letale und submicroscopische worwechsel der plastiden // Exp. Cell. Res.—1957.—12.—S. 427—506.
18. Гавриленко В. Ф., Ладыгина М. Е., Хандобина Л. М. Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез. Дыхание.—М.: Высш. шк., 1975.—392 с.
19. Бурлакина А. В., Дьячкин И. И., Лысенко Л. В. Метод определения сухого вещества в листьях табака в период уборки // Сб. науч.-исслед. работ ВИТИМ.—1978.—Вып. 157.—С. 15—19.
20. McDonald K., Truong M., Britton G., DellaPenna D. *Arabidopsis* carotenoid mutants demonstrate lutein is not essential for photosynthesis in higher plants // Plant Physiol.—1996.—111, N 2.—P. 109.

УДК 575.224.46.044:577.127:3
Поступила в редакцию 03.09.98