

УДК 581.154+575.224.46: 582.542.1.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАСТЕНИЙ *FESTUCA PRATENSIS* HUDS. С СУПРЕССИРОВАННОЙ ХЛОРОФИЛЛДЕФЕКТНОСТЬЮ

О. Н. Лебедева, А. Ф. Титов, Т. С. Николаевская, Е. Б. Стафеева

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Представлены результаты исследований физиологических особенностей растений многолетнего перекрестноопыляющегося злака *Festuca pratensis* Huds. с супрессированной хлорофиллдефектностью. Установлено, что генетической основой хлорофиллдефектности растений данного типа является мутация (и) с плеiotропным эффектом, затрагивающая пути синтеза зеленых и желтых (каротинов, лютеина и ксантофиллов) пигментов и сопровождающаяся изменением экспрессии морфофизиологических признаков по сравнению с растениями *w-type*.

Ключевые слова: *Festuca pratensis* Huds., супрессированная хлорофиллдефектность, зеленые и желтые пигменты, фотосинтетический аппарат, нетто-фотосинтез.

**O. N. Lebedeva, A. F. Titov, T. S. Nikolaevskaya, E. B. Stafeeva.
PHYSIOLOGICAL FEATURES OF *FESTUCA PRATENSIS* HUDS. PLANTS
WITH SUPRESSED OF CHLOROPHYLL DEFICIENCY**

Results of research into the physiological features of the perennial allogamous cereal *Festuca pratensis* Huds. with suppressed chlorophyll deficiency are presented. We found that the genetic basis of chlorophyll deficiency in plants of this type is the mutation (s) with the pleiotropic effect, which affects the pathways of synthesis of auxiliary light-absorbing and photoprotective green (*a*-, *b*-chlorophyll) and yellow (carotene, lutein and xanthophyll) pigments and is accompanied by change in the expression of morpho-physiological traits as compared with *w-type* plants.

Key words: *Festuca pratensis* Huds., pigment mutations, green and yellow pigments, suppression of chlorophyll deficiency, photosynthetic apparatus, net-photosynthesis.

Введение

У растений, важнейшей биологической особенностью которых является способность к фотосинтезу, большое значение имеют различного рода нарушения в биосинтезе пигментов, и прежде всего хлорофиллов (хлорофиллдефектность). В связи с этим изучение физиологических особенностей, таких как, например, содержание пигментов, скорость фотосинтетических

реакций, фотопротекторные свойства, играет важную роль в понимании механизмов, приводящих к структурно-функциональным изменениям фотосинтетического аппарата у растений с хлорофиллдефектностью.

Исследование этих механизмов связано, как правило, с использованием пигментных мутантов ядерного типа, у которых блокированы отдельные звенья синтеза пигментов и отсутствует способность к его восстановлению

[Найлэн, 1967]. Наш модельный объект – овсяница луговая (*Festuca pratensis* Huds.), как показано ранее, содержит значительный пул естественных хлорофильных мутаций, большая часть которых способна специфически восстанавливаться до дикого фенотипа [Олимпиенко и др., 1976; Титов, Олимпиенко, 1976; Титов и др., 1978], и этот процесс сопровождается определенными структурными изменениями хлоропластов и митохондрий [Венжик и др., 2002].

Цель настоящего исследования – изучение физиологических особенностей растений овсяницы луговой с супрессированной хлорофиллдефектностью и с различными механизмами восстановления пигментации до дикого фенотипа.

Материалы и методы

Работа проводилась на растениях овсяницы луговой с. Онежская, который был создан на основе северных экотипов вида [Винниченко, 1967; Лебедева и др., 1995]. Фенотипическое проявление пигментных нарушений у растений данного сорта происходит при определенных условиях культивирования. С целью их выявления семена проращивали в течение 10 суток на фильтровальной бумаге в фитотроне при непрерывном освещении ($96\text{--}120\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), температуре 35°C и влажности 70%. В массиве проростков регистрировали зеленые (*w-type*) и депигментированные растения (десупрессия).

В работе использованы обозначения, общепринятые для хлорофильных мутаций: светло-зеленые (*viridsi*, V), желтые (*xantha*, X), белые (*albiana*, A). Комбинированные фенотипы обозначались как зелено-светло-зеленые (NV), светло-зелено-зеленые (VN), светло-зелено-желтые (VX), светло-зелено-белые (VA), желто-зеленые (XN), желто-светло-зеленые (XV), желто-белые (XA), бело-зеленые (AN), бело-светло-зеленые (AV), причем первая буква соответствовала окраске верхней половины листа, а вторая – нижней. Обозначения фенотипов образовывались из начальных латинских букв соответствующего типа депигментации, знака >, и начальных букв соответствующего типа восстановления, например, $V>N$, $V>VX$ и т.п.

Депигментированные проростки восстанавливали зеленую окраску листа (ресупрессия) с различной скоростью и двумя путями: через реверсию и репопуляцию. Окраска проростка до *w-type* путем реверсии восстанавливалась быстро при культивировании проростков при 25°C в течение последующих 4 суток или медленно – более 4 суток. В других случаях восстановление происходило через репопуляцию клеток базальной части проростка: быстрое наблюдалось уже на 7-е сутки при температуре

35°C , а медленное, так же как и реверсия, – при 25°C . Используя различные сочетания скорости и механизмов восстановления (быстрая реверсия – медленная реверсия и быстрая репопуляция – медленная репопуляция), мы выделили несколько фенотипических групп проростков. Пигментация полностью восстанавливалась к моменту перехода растений в фазу кущения (растения-ревертаны).

В дальнейшем растения-ревертаны (функциональные ревертаны), маркированные по типу депигментации и восстановления в фазе проростков, выращивали в течение 6 лет в полевых условиях в виде клонов, полученных методом вегетативного деления материнских 2-летних особей. Каждый клон состоял из 8 растений, размещенных с расстоянием 60×60 см.

Содержание пигментов определяли у растений третьего года жизни, рассчитывая распределение и соотношение зеленых и желтых пигментов между светособирающими антенными комплексами (ССК) и реакционными центрами (РЦ) фотосистем I и II [Lichtenthaler, 1987]. Содержание и расчет концентрации хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов осуществляли по общепринятым методикам [Шлык, 1968; Методы биохимического анализа растений, 1978]. Для разделения каротиноидов использовали метод адсорбционной тонкослойной хроматографии, основанный на различной адсорбции составных частей смеси на твердом адсорбенте [Березов, Коровкин, 1990]. Извлечение пигментов [Сапожников, 1964], их фракционирование и идентификацию [Методы биохимического анализа растений, 1978; Дараселия и др., 1983; Досон и др., 1991] также проводили по стандартным методикам.

Работу виолоксантинового цикла определяли с помощью критерия эффективности дезоксидации (КЭД) по формуле $\text{КЭД}=(A+Z)/(A+Z+V)$, где *A* – количество антраксантина, *Z* – зеаксантина, *V* – виолоксантина [Elrad et al., 2002].

Эффективность работы фотосинтетического аппарата (ФСА) оценивали в полевом и лабораторном экспериментах с помощью флуориметра MINI-PAM (Walz, Германия) [Hetherington et al., 1998]. При этом использованы основные параметры, характеризующие различные стороны фотосинтетического транспорта электронов: *Fo*, *Fv* и *Fm* – основная (фоновая), переменная и максимальная флуоресценция адаптировавшихся к темноте образцов растений; *Fv/Fm* – потенциал фотохимической эффективности (потенциальный квантовый выход фотохимии); *Yield* (*Y*) – эффективный (фактический) выход фотохимического превращения энергии; *qP* – фотохимическое тушение; *qN* – нефотохимическое тушение; *NPQ* – часть нефотохимического

тушения хлорофилла *a*, рассеянного в виде тепла [Maxwell, Johnson, 2000].

Нетто-фотосинтез изучали с помощью поративного прибора НСМ-1000 [Германия] на растениях, достигших фазы кущения (10–12 вегетативных побегов) и выращенных в лабораторных условиях в вазонах с почвенным субстратом при температуре воздуха 25°C, его относительной влажности 50–60 %, интенсивности света 144 $\mu\text{моль}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ ФАР, при фотопериоде 14 ч, температура листа 25–28°C. Условия изучения газообмена внутри листовой камеры площадью 2,5 см^2 : температура воздуха 25°C, его относительная влажность 50–60%, интенсивность света 800, 500, 300, 100 и 0 $\mu\text{моль}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ ФАР. По данным эксперимента были построены световые кривые нетто-фотосинтеза [Мокроносов, 1983].

Все результаты обработаны с помощью общепринятых методов вариационной статистики (Зайцев, 1984).

Результаты и обсуждение

Анализ зеленых пигментов у растений с супрессированной хлорофиллдефектностью 3-го года жизни, маркированных в ювенильной фазе развития по характеру хлорофильного дефекта, показал, что у большинства фенотипов (V, VN, XN, XV, A) наблюдается повышенное содержание хлорофилла *a* в реакционных центрах (на 20–30 %) и суммарного его количества (на 13–18 %) по отношению к этим показателям у

растений *w-type*. Обращает на себя внимание, что три хлорофиллдефектных фенотипа являются ранними ревертантами (VN, XN, XV), то есть восстановление пигментации у них проявляется при 35° путем репопуляции (табл. 1).

В отличие от зеленых пигментов количество каротиноидов в растениях оказалось зависимым от характера хлорофильного дефекта. Так, растения с фенотипами *viridis* и *xantha* характеризуются пониженным содержанием каротина (на 30–35 %), лютеина (на 20–25 %), зеа-+ антераксантина (на 13–17 %) и суммы ксантофиллов в целом (на 10 %), а с фенотипом *albina* – повышенным содержанием лютеина (на 35 %), неоксантина (на 30 %) и общего пула ксантофиллов (на 8%) (табл. 2).

Установлено, что состав зеленых пигментов растений с супрессированной хлорофиллдефектностью связан только с определенными механизмами восстановления пигментации при ресупрессии. При восстановлении хлорофильного дефекта путем репопуляции (быстрой и медленной) у растений всех фенотипических групп наблюдается увеличенное содержание хлорофилла *a* на 12–23 % в РЦ и на 22–40 % его суммарного количества. У растений-ревертантов с фенотипами *viridis* и *xantha* и с восстановлением через реверсию (быструю и медленную) отмечено снижение (в среднем на 10 %) количества хлорофилла *b* относительно *w-type* и, как следствие, снижение на 15 % суммы хлорофиллов *a+b* в ССК. Содержание зеленых пигментов (*a*, *b*, в ССК и в РЦ) у растений, характеризую-

Таблица 1. Содержание пигментов в растениях *Festuca pratensis*, различающихся типом хлорофильного дефекта

Фенотип	Содержание и соотношение пигментов, мг/г сырого веса						
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a/b</i>	ССК	РЦ	<i>c</i>	<i>c/a</i>
<i>w-type</i>	1,14±0,05	0,49±0,01	2,33±0,07	1,13±0,08	0,55±0,04	0,29±0,01	0,25±0,02
V	1,34±0,07*	0,55±0,05	2,44±0,03*	1,21±0,11	0,68±0,04*	0,36±0,02*	0,27±0,01
VN	1,31±0,05*	0,53±0,03	2,47±0,06*	1,16±0,06	0,67±0,02*	0,24±0,01*	0,18±0,02*
VX	1,15±0,07	0,47±0,02	2,45±0,05	1,04±0,05	0,59±0,05	0,26±0,02	0,23±0,01
X	1,14±0,03	0,45±0,01*	2,53±0,03*	0,99±0,03*	0,60±0,02	0,31±0,09	0,27±0,01
XN	1,30±0,01*	0,52±0,01*	2,50±0,05*	1,15±0,03	0,67±0,01*	0,31±0,03	0,24±0,01
XV	1,34±0,09*	0,53±0,08	2,53±0,05*	1,16±0,17	0,71±0,11*	0,34±0,11	0,25±0,02
A	1,29±0,07*	0,49±0,03	2,63±0,10*	1,08±0,06	0,69±0,04*	0,35±0,03*	0,27±0,04

* Здесь и в табл. 2–4 отличия в содержании пигментов у растений с хлорофиллдефектностью от *w-type* значимы при $p < 0,05$.

Таблица 2. Содержание желтых пигментов в растениях *Festuca pratensis*, различающихся типом хлорофильного дефекта

Фенотип	Содержание желтых пигментов, мг/г сырого веса						КДЭ
	каротин	лютеин	виолаксантин	зеаксантин+антераксантин	неоксантин	сумма ксантофиллов	
<i>w-type</i>	0,114±0,012	0,131±0,010	0,040±0,004	0,224±0,015	0,033±0,003	0,297±0,007	0,848±0,010
V	0,074±0,007*	0,104±0,009*	0,039±0,003	0,195±0,011*	0,027±0,003	0,257±0,004*	0,847±0,007
VN	0,094±0,012	0,131±0,010	0,042±0,004	0,248±0,015	0,033±0,004	0,323±0,009*	0,849±0,011
X	0,077±0,007*	0,099±0,008*	0,041±0,005	0,185±0,014*	0,035±0,004	0,261±0,008*	0,820±0,013*
XN	0,122±0,012	0,126±0,011	0,041±0,003	0,228±0,017	0,035±0,003	0,304±0,011	0,853±0,016
XV	0,095±0,012	0,112±0,013	0,036±0,004	0,199±0,019	0,029±0,004	0,264±0,013*	0,854±0,018
A	0,099±0,011	0,177±0,007*	0,046±0,004	0,231±0,017	0,043±0,004*	0,320±0,008*	0,834±0,008

щихся быстрым восстановлением пигментации к *w-type* через репопуляцию, выше относительно среднего по группе фенотипов, чем при реверсии. И, напротив, при медленных реверсии и репопуляции эти же показатели оказались одинаковыми. Соотношение зеленых пигментов (*a/b*) у растений отдельных фенотипов, как и средних значений по группе фенотипов, выше, чем у *w-type* при реверсии и репопуляции (быстрой и медленной) (табл. 3).

Содержание желтых пигментов (среднее значение по группе фенотипов с тем или иным типом восстановления) у растений с супрессированной хлорофиллдефектностью было ниже уровня *w-type* или не отличалось от него. Так, количество каротина оказалось на уровне, характерном для *w-type*, только при быстрой репопуляции и было снижено (на 21–38 %) при других типах восстановления: медленная репопуляция, быстрая и медленная реверсия (табл. 4).

Содержание лютеина зависело от скорости восстановления: при быстром оно достигало уровня *w-type*, а при медленном было ниже его на 15–32 %. Выявляется специфика механизмов восстановления: при быстром лютеина больше на 30–40 % (при реверсии и репопуляции соответственно) и КДЭ выше на 10 % по сравнению с медленным. При быстрой репопуляции выше (в 1,5 раза) количество каротина, зеаксантина + антераксантина (в 1,4 раза) и сумма ксантофиллов (в 1,5 раза) по

сравнению с медленной репопуляцией (см. табл. 4).

Следует отметить и фенотипические особенности растений с супрессированной хлорофиллдефектностью в содержании отдельных фракций каротиноидов. Так, у растений с фенотипами *viridis* и *xantha*, независимо от скорости и путей фенотипических изменений окраски растений при ресупрессии, снижено количество каротина, лютеина, зеаксантина+антераксантина и суммы ксантофиллов. У ранних ревертантов, восстанавливающихся до нормального фенотипа (VN и XN) путем быстрой репопуляции, напротив, наблюдается количественный рост этих показателей (на 17–45 %). Растения с фенотипом *albina* характеризуются специфическим содержанием отдельных фракций каротиноидов и отличаются по ряду показателей от *viridis*- и *xantha*- фенотипов (см. табл. 4).

Потенциал фотохимической эффективности открытых центров фотосистемы II (*Fv/Fm*) достигал у растений *w-type* 0,74, что указывает на развитость ФСА. *Fv/Fm* при умеренной инсоляции в условиях лабораторного эксперимента у растений с супрессированной хлорофиллдефектностью и медленной реверсией не отличался, а с медленной репопуляцией незначительно был снижен относительно *w-type*. *Yield* и *qP* на 25 % выше при медленной репопуляции, чем у растений *w-type*, величина *NPQ* снижена на 15 % (табл. 5).

Таблица 3. Содержание пигментов в растениях *Festuca pratensis*, различающихся механизмом восстановления пигментации при ресупрессии

Фенотип	Содержание и соотношение пигментов, мг/г сырого веса						
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a/b</i>	ССК	РЦ	<i>c</i>	<i>c/a</i>
<i>w-type</i>	1,14±0,05	0,49±0,01	2,33±0,07	1,13±0,08	0,55±0,04	0,29±0,01	0,25±0,02
Быстрое восстановление (репопуляция) при 35°C							
VN>N, VN>VN	1,30±0,06*	0,52±0,03	2,54±0,04*	1,14±0,07	0,69±0,03*	0,25±0,02*	0,19±0,01*
XN>N	1,30±0,02*	0,52±0,02	2,53±0,06*	1,14±0,04	0,68±0,01*	0,29±0,04	0,22±0,02
XV>V, XV>VN	1,40±0,10*	0,52±0,05	2,79±0,08*	1,14±0,08	0,77±0,05*	0,32±0,04	0,23±0,03
Среднее по группе	1,33±0,06*	0,52±0,03	2,62±0,06*	1,14±0,06	0,71±0,003*	0,29±0,03	0,21±0,02
Медленное восстановление (репопуляция) при 25°C							
V>VN	1,32±0,08*	0,48±0,07	2,77±0,08*	1,06±0,05	0,74±0,07	0,36±0,01*	0,27±0,03
X>XN	1,20±0,07	0,44±0,06	2,73±0,09*	0,97±0,07*	0,67±0,04*	0,33±0,03	0,28±0,01
A>AV	1,31±0,09*	0,48±0,04	2,73±0,07*	1,06±0,08	0,74±0,06*	0,32±0,02	0,24±0,01
Среднее по группе	1,28±0,08*	0,47±0,06	2,74±0,08*	1,03±0,07	0,72±0,06*	0,34±0,02*	0,26±0,02
Быстрое восстановление (реверсия) при 25°C							
V>N	1,02±0,09	0,44±0,03*	2,35±0,14	0,96±0,06*	0,49±0,08	0,25±0,02*	0,25±0,03
X>N	1,08±0,05	0,43±0,02*	2,57±0,09*	0,99±0,04*	0,58±0,04	0,32±0,03	0,30±0,01
A>V	1,16±0,06	0,44±0,04	2,68±0,11*	0,97±0,09	0,64±0,02*	0,32±0,09	0,28±0,05
Среднее по группе	1,09±0,06	0,44±0,03*	2,53±0,11*	0,97±0,06*	0,57±0,05	0,30±0,05	0,28±0,03
Медленное восстановление (реверсия) при 25°C							
V>V	1,20±0,04	0,45±0,02*	2,69±0,10*	0,99±0,05*	0,66±0,03*	0,40±0,04*	0,33±0,02*
X>X	1,11±0,08	0,43±0,03*	2,52±0,07*	0,96±0,07*	0,58±0,04	0,28±0,03	0,25±0,02
A>A	1,14±0,04	0,46±0,04	2,48±0,09	1,02±0,09	0,58±0,05	0,34±0,04	0,30±0,03
Среднее по группе	1,15±0,05	0,44±0,03*	2,56±0,09*	0,99±0,07*	0,61±0,04	0,34±0,04	0,29±0,02

Таблица 4. Содержание каротиноидов в растениях *Festuca pratensis*, различающихся механизмом восстановления пигментации при ресупрессии

Фенотип	Содержание каротиноидов, мг/г сырого веса						КДЭ
	каротин	лютеин	виолаксантин	зеаксантин+антераксантин	неоксантин	сумма ксантофиллов	
<i>w-type</i>	0,114±0,012	0,131±0,010	0,040±0,004	0,224±0,015	0,033±0,003	0,297±0,007	0,848±0,010
Быстрое восстановление (репопуляция) при 35°C							
VN>N	0,065±0,012*	0,109±0,010*	0,038±0,004	0,174±0,014*	0,028±0,004	0,240±0,007*	0,821±0,008*
VN>VN	0,123±0,011	0,152±0,010*	0,045±0,005	0,322±0,015*	0,037±0,004	0,404±0,011*	0,877±0,014*
XN>N	0,148±0,012*	0,139±0,010	0,045±0,003	0,257±0,015*	0,040±0,002*	0,342±0,010*	0,851±0,013
XN>VN, XV>V, XV>VN	0,095±0,012	0,112±0,013	0,036±0,004	0,199±0,019	0,029±0,004	0,264±0,013*	0,854±0,018
Среднее по группе	0,108±0,014	0,128±0,011	0,047±0,004	0,238±0,016	0,038±0,004	0,323±0,010*	0,857±0,013
Медленное восстановление (репопуляция) при 25°C							
V>VN	0,068±0,005*	0,094±0,015*	0,033±0,006	0,176±0,011*	0,024±0,003*	0,233±0,006*	0,842±0,015
X>VN, X>XV, X>AV	0,073±0,005*	0,085±0,011*	0,040±0,007	0,160±0,013*	0,044±0,002*	0,244±0,007*	0,805±0,014*
Среднее по группе	0,071±0,005*	0,089±0,013*	0,037±0,007	0,168±0,012*	0,034±0,003	0,251±0,007*	0,823±0,015
Быстрое восстановление (реверсия) при 25°C							
V>N	0,086±0,013*	0,110±0,005*	0,037±0,001	0,212±0,015	0,031±0,005	0,280±0,004*	0,851±0,003
X>N	0,077±0,011*	0,101±0,009*	0,042±0,003	0,182±0,015*	0,031±0,004	0,255±0,011*	0,813±0,015*
A>V	0,103±0,012	0,237±0,012*	0,050±0,004	0,253±0,020	0,028±0,002	0,331±0,008*	0,835±0,012
Среднее по группе	0,089±0,012*	0,149±0,009	0,039±0,003	0,215±0,016	0,030±0,004	0,285±0,007	0,845±0,010
Медленное восстановление (реверсия) при 25°C							
V>V	0,068±0,004*	0,107±0,006*	0,046±0,003	0,198±0,007*	0,027±0,001*	0,271±0,003*	0,812±0,004*
X>X	0,082±0,006*	0,112±0,006*	0,040±0,005	0,213±0,014	0,030±0,002	0,301±0,006	0,842±0,010
A>A	0,095±0,011	0,116±0,003*	0,042±0,004	0,208±0,013	0,058±0,006*	0,308±0,008	0,832±0,004
Среднее по группе	0,082±0,007*	0,111±0,005*	0,043±0,004	0,206±0,011	0,038±0,003	0,293±0,006	0,828±0,006*

Таблица 5. Эффективность работы фотосинтетического аппарата (ФСА) растений *Festuca pratensis*, различающихся механизмом восстановления пигментации при ресупрессии

Фенотип	Показатели эффективности работы ФСА				
	<i>Fv/Fm</i>	<i>Yield</i>	<i>qP</i>	<i>qN</i>	<i>NPQ</i>
Лабораторный эксперимент, умеренный уровень инсоляции					
<i>w-type</i>	0,74±0,01	0,34±0,03	1,05±0,05	0,78±0,01	1,46±0,09
Медленная репопуляция	0,72±0,07*	0,42±0,02*	1,32±0,11*	0,78±0,01	1,26±0,07*
Медленная реверсия	0,73±0,06	0,39±0,04	1,06±0,10	0,77±0,05	1,36±0,09
Полевой эксперимент, высокий уровень инсоляции					
<i>w-type</i>	0,73±0,03	0,41±0,050	1,21±0,12	0,79±0,08	1,43±0,23
Медленная репопуляция	0,72±0,03	0,28±0,040*	1,50±0,08*	0,89±0,05	1,72±0,14
Быстрая реверсия	0,75±0,03*	0,34±0,027	1,25±0,09	0,78±0,05	1,53±0,09
Медленная реверсия	0,74±0,03*	0,38±0,051	1,27±0,11	0,83±0,08	1,80±0,09*

Примечание. Отличия показателей эффективности работы фотосинтетического аппарата у растений с хлорофиллдефектностью от *w-type* значимы при $p < 0,05$.

Анализ световых кривых нетто-фотосинтеза листьев исследованных групп растений, различающихся механизмами восстановления пигментации при ресупрессии (быстрая и медленная репопуляция, быстрая и медленная реверсия), и у *w-type* показал, что по мере увеличения освещенности (с 100 до 800 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ ФАР) скорость поглощения CO₂ возрастает у растений всех групп (рис.).

Растения с быстрой репопуляцией и реверсией к зеленому фенотипу характеризовались большим по сравнению с растениями с медленной реверсией и репопуляцией, как и с *w-type*, углом наклона прямолинейного участка

световой кривой, отражающим высокую эффективность использования световой энергии в ходе фотосинтеза. Максимальные значения фотосинтеза при насыщающей интенсивности света (500–800 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ ФАР) на 30 % выше у растений с медленной репопуляцией по сравнению с медленной реверсией и *w-type*.

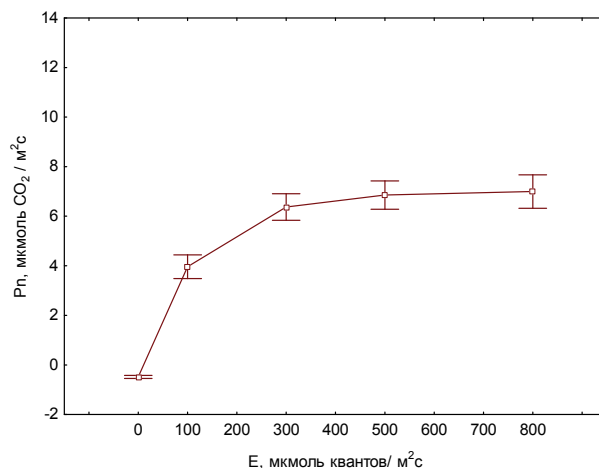
Таким образом, скорость нетто-фотосинтеза листьев растений с супрессированной хлорофиллдефектностью исследованных групп растений, различающихся механизмами восстановления пигментации, оказалась зависимой от механизма восстановления пигментации проростков при ресупрессии.

Оценка эффективности работы ФСА у растений с супрессированной хлорофиллдефектностью в полевом эксперименте (высокий уровень инсоляции) показала иные результаты (см. табл. 5). При реверсии (быстрой и медленной) незначительно увеличен показатель, характеризующий потенциал фотохимической эффективности открытых центров фотосистемы II (F_v/F_m), а также у хлорофиллдефектных фенотипов, восстановление которых при ресупрессии проходило путем медленной репопуляции до фенотипической нормы ($X > X_N$, $A > A_N$). Эффективный выход фотохимического превращения энергии ($Yield$) (среднее значение по группе фенотипов) при медленной репопуляции понижен на 30 %, а для отдельных фенотипов – до 46 %, причем снижение отмечено и для растений с быстрой реверсией ($X > N$, $A > VN$). При медленной репопуляции показатель фотохимического тушения (qP) флуоресценции хлорофилла *a*, напротив, увеличен от 25 до 53 % как для отдельных фенотипов, так и для среднего значения по группе фенотипов. Величина нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* (qN) и нефотохимического тушения в виде тепловой диссипации (NPQ), которая на 75 % осуществляется пигментами виолоксантинового цикла, для большинства растений с супрессированной хлорофиллдефектностью не отличается от *w-type* или превышает его уровень ($X > X_N$, $X > V_X$) и с определенными механизмами восстановления при ресупрессии не связана. По показателям электронного транспорта проявляется эффект хлорофиллдефектного фенотипа, выраженный в повышении ($X > X_N$, $X > V_X$, $A > VN$) или снижении ($A > VN$, $X > N$) значений относительно *w-type* (см. табл. 5). Материалы эксперимента, полученные при высокой инсоляции (полевой опыт) и характеризующие эффективность работы ФСА растений с хлорофиллдефектностью, не коррелируют с полученными при умеренной инсоляции (лабораторный опыт).

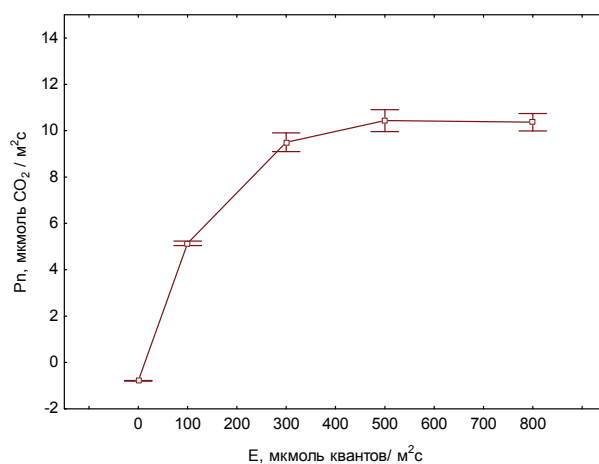
Наши результаты и имеющиеся в литературе данные по генетическому контролю синтеза зеленых [Suzuki, Bauer, 1995; Reinbothe S., Reinbothe C., 1996; Suzuki et al., 1997; Beale, 1999; Suzuki, Shioi, 1999; Eckhardt et al., 2004] и желтых [Demmig-Adams B. et al., 1990; Pogson et al., 1996; Bugos et al., 1998; Bouvier et al., 2000; Lindgren, 2003; Kato et al., 2004] пигментов позволили сформировать рабочую модель, отражающую особенности синтеза пигментов у растений *F. pratensis* с супрессированной хлорофиллдефектностью.

Как представляется, у части растений *F. pratensis* с супрессированной хлорофиллдефектностью при ресупрессии включается репопуляционное восстановление пигментации проростков (при 35 и 25°C) до *w-type*, которое проявля-

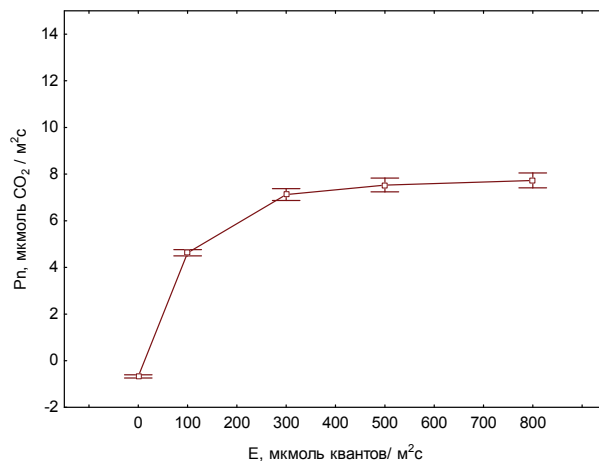
А



Б



В



Световые кривые нетто-фотосинтеза у растений *Festuca pratensis*

А – *w-type*; Б – при медленной репопуляции; В – при медленной реверсии. По оси ординат – P_n , $\mu\text{моль CO}_2/\text{м}^2\cdot\text{с}$, по оси абсцисс – E , $\mu\text{моль квантов}/\text{м}^2\cdot\text{с}$

ется в комплексном эпистатическом действии двух генов – мутантного и супрессора. При этом обеспечивается не только повышенный уровень

хлорофилла *a* в реакционных центрах фотосистемы II, но и содержание хлорофилла *b* по сравнению как с растениями *w-type*, так и с растениями с супрессированной хлорофиллдефектностью, восстановление пигментации у которых проходило путем реверсии. Можно предположить, что в этом случае повышена активность фермента *хлорофиллид а оксигеназы* (CAO), контролирующего поздние стадии синтеза хлорофилла *a* и *b* через усиление экспрессии гена и/или через регуляторные механизмы, к числу которых относится и эпистатическое действие мутантного гена и гена-супрессора и обеспечивается синтез зеленых пигментов на уровне «фенотипической нормы» (*w-type*), или повышенный уровень хлорофилла *a*. Репопуляционное восстановление, как показано выше, проявляется при умеренной освещенности прежде всего по эффективности работы ФСА (интенсивности фотосинтеза, эффективному выходу фотохимического превращения энергии и фотохимическому тушению хлорофилла *a*, а также по другим показателям роста и развития растений (табл. 6).

Такая картина свойственна не всем растениям с супрессированной хлорофиллдефектностью. У большей части растений при ресупрессии наблюдается реверсия (восстановление

только при 25°C) окраски проростков до фенотипической нормы (зеленая окраска проростка, внешне не отличимая от *w-type*) или до хлорофиллдефектного фенотипа с менее глубоким типом депигментации, например, $X > V$, $A > V$. У таких растений содержание хлорофилла *a* сохраняется на уровне «фенотипической нормы» (*w-type*), а хлорофилла *b*, выполняющего функции светособирающего и фотозащитного пигмента [Eggink et al., 2001], понижено и соответственно уменьшен общий уровень зеленых пигментов в ССК фотосистемы II. Можно предположить, что этот уровень хлорофилла *b* связан как со снижением экспрессии генов, контролирующих поздние стадии синтеза хлорофилла *b*, так и/или со взаимным превращением хлорофиллов *a* и *b* в хлорофилловом цикле, в частности с понижением активности фермента CAO (Folly, Engel, 1999; Masuda, et al., 2002; Rudiger, 2002). У некоторых видов высших растений обнаружены мутанты, характеризующиеся низким содержанием хлорофилла *b*, вызванного снижением экспрессии гена, кодирующего CAO [Greene et al., 1988; Knoetzel, Simpson, 1991; Król et al., 1995; Falbel, Staehelin, 1996; Montané et al., 1998; Tanaka et al., 1998; Espineda et al., 1999; Mochizuki et al., 2001; Larkin et al., 2003].

Таблица 6. Зависимость экспрессии физиологических признаков от путей фенотипических изменений окраски проростков при ресупрессии у растений *Festuca pratensis* с супрессированной хлорофиллдефектностью на разных этапах их онтогенеза

Признак	Пути фенотипических изменений окраски проростков при ресупрессии			
	репопуляция		реверсия	
	быстрая	медленная	быстрая	медленная
Показатели физиологического состояния ФСА в генеративную фазу развития растений				
<i>a</i>	>	>	=	=
<i>b</i>	=	=	<↑	<↑
<i>a/b</i>	>	>	>	>
ССК	=	=↑	<	<
РЦ	>	>	=↑	=↑
<i>c</i>	=↑	>↑	=↑	=↑
<i>c/a</i>	=↑	=	=	=↑
Каротин	=↑	<	<↑	<↑
Лютеин	=↑	<	=↑	<↑
Виолаксантин	=	=↑	=	=
Зеаксантин + антераксантин	=↑	<	=↑	=↑
Неоксантин	=↑	=↑	=	=↑
Сумма ксантофиллов	>↑	<	=↑	=↑
КДЭ	=↑	=↑	=↑	<↑
<i>Fv/Fm</i>	–	=↑	>↑	>↑
<i>Yield</i>	–	<	=↑	=
<i>qP</i>	–	>↑	=↑	=
<i>qN</i>	–	=↑	=	=
<i>NPQ</i>	–	=↑	=	>↑
Показатели физиологического состояния ФСА в вегетативную фазу развития растений				
Нетто-фотосинтез (по интенсивности поглощения CO ₂)	–	>	–	=
<i>Fv/Fm</i>	–	<	–	=
<i>Yield</i>	–	>	–	=
<i>qP</i>	–	>	–	=
<i>qN</i>	–	=	–	=
<i>NPQ</i>	–	<	–	=

Примечание. Значения признаков у растений с супрессированной хлорофиллдефектностью: = не отличаются, > превышают (при $p < 0,05$), < ниже (при $p < 0,05$), чем у растений *w-type*, ↑ – выражен эффект хлорофиллдефектного фенотипа.

Мутантный ген, даже под прикрытием гена-супрессора, существенно затрагивает пути превращения каротиноидов. Сниженный уровень каротинов и лютеина почти при всех типах восстановления (при медленной репопуляции, медленной и быстрой реверсии) позволяет предположить, что у растений с супрессированной хлорофиллдефектностью понижена экспрессия генов, контролирующих синтез отдельных или ряда ферментов *Lycopene β -Cyclase* (LCY-b), *Lycopene ϵ -Cyclase* (LCY-e), *β -Carotene Hydroxylase* (BCH), *ϵ -Carotene Hydroxylase* (ECH), которые кодируются ядерными генами, а трансляция осуществляется в хлоропластах [Bartley, Scolnik, 1995].

Эти же ферменты участвуют и в синтезе пигментов ксантофиллового цикла зеаксантина и антераксантина, уровень которых также понижен у растений отдельных фенотипических групп (медленная репопуляция). Действие мутантного гена у растений с супрессированной хлорофиллдефектностью, как представляется, не сказывается на активности *Zeaxanthin Epoxidase* (ZEP) – содержание виолоксантина на уровне растений дикого типа и отсутствует зависимость от хлорофиллдефектного фенотипа, а также незначительно сказывается на активности *Violaxanthin De-epoxidase* (VDE). Нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a* (NPQ) при высокой инсоляции находится на уровне растений дикого типа. Снижена активность и *Neoxanthin Synthase* (NXS) – средние значения содержания неоксантина по типам восстановления не отличаются от растений *w-type*, хотя у отдельных фенотипов наблюдаются колебания его уровня (см. табл. 6).

Таким образом, температурозависимая хлорофиллдефектность у растений *F. pratensis* не только сопровождается структурными изменениями хлоропластов и митохондрий [Венжик и др., 2002], но и затрагивает пути синтеза вспомогательных светособирающих и фотозащитных зеленых (хлорофилла *b*) и желтых (каротинов, лютеина и ксантофиллов) пигментов, снижая уровень экспрессии генов, контролирующих их образование. При реверсии (быстрой и медленной) незначительно увеличен показатель, характеризующий потенциал фотохимической эффективности открытых центров фотосистемы II. При медленной репопуляции показатель фотохимического тушения (*qP*) флуоресценции хлорофилла *a* увеличен, а показатели нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* (*qN*) и нефотохимического тушения в виде тепловой диссипации (NPQ) для большинства растений с супрессированной хлорофиллдефектностью не отличаются от *w-type* или превышают его уровень и с

определенными механизмами восстановления при ресупрессии не связаны. Эффект хлорофиллдефектного фенотипа, выраженный в повышении или снижении значений относительно *w-type*, проявляется по показателям, характеризующим транспорт электронов в хлоропластах. Ген-супрессор лишь частично подавляет действие мутантного гена, что отражается на уровне приспособленности и ее компонентах – выживаемости и репродуктивной способности растений с супрессированной хлорофиллдефектностью. Механизмы восстановления пигментации при ресупрессии являются важным элементом феноменологии супрессированной хлорофиллдефектности.

Литература

- Берёзов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биохимия. М.: Медицина, 1990. 543 с.
- Венжик Ю. В., Николаевская Т. С., Олимпиаенко Г. С. и др. Особенности структуры клеток мезофилла у хлорофиллдефектных мутантов *Festuca pratensis* (Poaceae) // Ботан. журн. 2002. Т. 87, № 12. С. 48–58.
- Винниченко Е. Ф. Многолетние травы – основной источник кормов. Петрозаводск, 1967. 151 с.
- Дараселия Г. Я. Выделение и идентификация каротиноидных пигментов микобактерий // Методы биохимических исследований растений. Тбилиси, 1983. С. 92–100.
- Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. 543 с.
- Зайцев Г. Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. М.: Наука. 1984. 424 с.
- Лебедева О. Н., Олимпиаенко Г. С., Каичева Т. Н., Михайлова Т. Н. Авторское свидетельство на сорт овсяницы луговой «Онежская». Патент № 6675 от 05.05.1995 г.
- Методы биохимического анализа растений / Ред. В. В. Полевой и Г. Б. Максимов. Л.: изд-во Ленинградского ун-та, 1978. 192 с.
- Мокроносов А. М. Фотосинтетическая функция и целостность растительного организма. М.: Наука, 1983. 64 с.
- Найлэн Р. А. Природа индуцированных мутаций у высших растений // Генетика. 1967, № 3. С. 3–21.
- Олимпиаенко Г. С., Титов А. Ф., Митрофанов Ю. А. Депигментация проростков овсяницы луговой под влиянием температуры // Генетика. 1976. Т. 12, № 1. С. 153–155.
- Сапожников Д. И. Пигменты пластид зеленых растений и методика их исследования. М.; Л.: Наука. 1964. 120 с.
- Титов А. Ф., Олимпиаенко Г. С. Частота хлорофиллдефектных проростков в селекционных потомствах овсяницы луговой (*Festuca pratensis* Huds.) // Генетика. 1976. Т. 12, № 2. С. 162–164.
- Титов А. Ф., Олимпиаенко Г. С., Павлова Н. А. О возможной селективной ценности температурочувствительных хлорофильных мутаций у овсяницы луговой // Журн. общ. биологии. 1978. Т. 39, № 4. С. 628–632.

- Шлык А. А. О спектрофотометрическом определении хлорофиллов *a* и *b* // Биохимия. 1968. Т. 33, вып. 2. С. 275–295.
- Bartley G. E., Scolnik P. A. Plant Carotenoids: Pigments for Photoprotection, Visual Attraction, and Human Health // The Plant Cell. 1995. Vol. 7. P. 1027–1038.
- Beale S. I. Enzymes of chlorophyll biosynthesis // Photosynth. Res. 1999. Vol. 60. P. 43–73.
- Bouvier F., Hugueney P., d'Harlingue A. et al. Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog // Eur. J. Biochem. 2000. Vol. 267. P. 6346–6352.
- Bugos R. C., Hieber A. D., Yamamoto H. Y. Xanthophyll cycle enzymes are members of the lipocalin family, the first identified from plants // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. P. 15321–15324.
- Demmig-Adams B., Gilmore A. M., Adams W. W. Carotenoids: III. *In vivo* function of carotenoids in higher plants // FASEB. 1996. Vol. 10. P. 403–412.
- Demmig-Adams B., Adams W. W., Heber U. et al. Inhibition of zeaxanthin formation and of rapid changes in radiation less energy dissipation by dithiothreitol in spinach leaves and chloroplasts // Plant Physiol. 1990. Vol. 92. P. 293–301.
- Eckhardt U., Grimm B., Hörtensteiner S. Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants // Plant Mol. Biol. 2004. Vol. 56. P. 1–14.
- Eggink L. L., Park H., Hooper J. K. The role of chlorophyll *b* in photosynthesis: Hypothesis // BMC Plant Biol. 2001. Vol. 1:2.
- Elrad D., Niyogi K. K., Grossman A. R. A major light-harvesting polypeptide of photosystem II functions is thermal dissipation // Plant Cell. 2002. Vol. 14. P. 1801–1816.
- Espineda C. E., Linford A. S., Devine D., Brusslan J. A. The *at* CAO-gene, encoding chlorophyll *a* oxygenase, is required for chlorophyll *b* synthesis in *Arabidopsis thaliana* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. P. 10507–10511.
- Falbel T. G., Staehelin L. A. Partial blocks in the early steps of the chlorophyll synthesis pathway: a common feature of chlorophyll *b*-deficient mutants // Plant Physiol. 1996. Vol. 97. P. 311–320.
- Folly P., Engel N. Chlorophyll *b* to Chlorophyll *a* Conversion Precedes Chlorophyll Degradation in *Hordeum vulgare* L. // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274. P. 21811–21816.
- Greene B. A., Allred D. R., Morishige D. G., Stachel L. A. Hierarchical response of light-harvesting chlorophyll proteins in a light-harvesting chlorophyll-*b*-deficient mutants maize // Plant Physiol. 1988. Vol. 87. P. 357–364.
- Hetherington S. E., Smille R. M., Davies W. J. Photosynthetic activities of vegetative and fruiting tissues of tomato // J. Exp. Botany. 1998. Vol. 49. P. 1173–1181.
- Kato M., Ikoma Y., Matsumoto H. et al. Accumulation of Carotenoids and Expression of Carotenoid Biosynthetic Genes during Maturation in Citrus Fruit1 // Plant Physiol. 2004. Vol. 134. P. 824–837.
- Knoetzel J., Simpson D. Expression and organization of antenna proteins in the light- and temperature-sensitive barley mutant chlorina104 // Planta. 1991. Vol. 185. P. 111–123.
- Król M., Spangfort M. D., Huner N. P. A. et al. Chlorophyll *a/b*-binding proteins, pigment conversions, and early light-induced proteins in a chlorophyll *b*-less barley mutant // Plant Physiol. 1995. Vol. 107. P. 873–883.
- Larkin R. M., Alonso J. M., Ecker J. R., Chory J. GUN4, a Regulator of Chlorophyll Synthesis and Intracellular Signaling // Science. 2003. Vol. 299. P. 902–906.
- Lichtenthaler H. K. Chlorophylls and carotenoids – pigments of photosynthetic biomembranes // Methods in enzymology. San Diego; New York; Berkeley; Boston; London–Sydney; Tokyo; Toronto: Acad. Press, 1987. Vol. 148. P. 350–382.
- Lindgren O. Carotenoid Biosynthesis in Seed of *Arabidopsis thaliana*: doctoral thesis... Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2003. 33 p.
- Masuda T., Tanaka A., Melis A. Chlorophyll antenna size adjustments by irradiance in *Dunaliella salina* involve coordinate regulation of chlorophyll *a* oxygenase (CAO) and Lhcb gene expression // Proceedings of the 2002 U.S. DOE Hydrogen Program Review. 2002. P. 1–22.
- Maxwell K., Johnson G. N. Chlorophyll fluorescence-a practical guide // J. Exp. Botany. 2000. Vol. 51. P. 659–668.
- Mochizuki N., Brusslan J. A., Larkin R. et al. *Arabidopsis* genome uncoupled 5 (*gun5*) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. Vol. 98. P. 2053–2058.
- Montané M.-H., Tardy F., Kloppstech K., Havaux M. Differential control of xanthophylls and light-induced stress proteins, as opposed to light-harvesting chlorophyll *a/b* proteins, during photosynthetic acclimation of barley leaves to light irradiance // Plant Physiol. 1998. Vol. 118. P. 227–235.
- Niyogi K. K. Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches // Annu. Rev. Plant Physiol. & Mol. Biol. 1999. Vol. 50. P. 333–359.
- Pogson B. J., McDonald K. A., Truong M. et al. *Arabidopsis* carotenoid mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants // Plant Cell. 1996. Vol. 8. P. 1627–1639.
- Reinbothe S., Reinbothe C. The regulation of enzymes involved in chlorophyll biosynthesis // Eur. J. Biochem. 1996. Vol. 237. P. 323–243.
- Rudiger W. Biosynthesis of chlorophyll *b* and the chlorophyll cycle // Photosynth. Res. 2002. Vol. 74. P. 187–193.
- Suzuki J. Y., Bauer C. E. Altered monovinyl and divinyl protochlorophyllide pools in *bch J* mutants of *Rhodobacter capsulatus*. Possible monovinyl substrate discrimination of light-independent protochlorophyllide reductase // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. P. 3732–3740.
- Suzuki J. Y., Bollivar D. W., Bauer C. E. Genetic analysis of chlorophyll biosynthesis // Ann. Rev. Genet. 1997. Vol. 31. P. 61–89.
- Suzuki J. Y., Shioi Y. Detection of chlorophyll breakdown products in the senescent leaves of higher plants // Plant Cell Physiol. 1999. Vol. 40. P. 909–915.
- Suzuki J. Y., Doi M., Shioi Y. Two enzymatic reaction pathways in the formation of pyropheophorbide *a* // Photosynth. Res. 2002. Vol. 74. P. 225–233.
- Tanaka A., Ito H., Tanaka R. et al. Chlorophyll *a* oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll *b* formation from chlorophyll *a* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. Vol. 95. P. 12719–12723.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Лебедева Ольга Николаевна

зам. директора по научной работе, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: lebedeva@krc.karelia.ru
тел. (8142) 774682

Титов Александр Федорович

Председатель КарНЦ РАН, д.б.н., проф., чл.-корр. РАН
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: titov@krc.karelia.ru

Николаевская Татьяна Сергеевна

старший научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: nicoltn@mail.ru
тел. (8142) 573107

Стафеева Елена Борисовна

младший научный сотрудник
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: stafeevalena@mail.ru
тел. (8142) 573107

Lebedeva, Olga

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: lebedeva@krc.karelia.ru
tel. (8142) 774682

Titov, Aleksandr

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: titov@krc.karelia.ru

Nikolaevskaya, Tatiana

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: nicoltn@mail.ru
tel. (8142) 573107

Stafeeva, Elena

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: stafeevalena@mail.ru
tel. (8142) 573107