

УДК 581.132.144

Ю.Г. МАСІКЕВИЧ

Чернівецький факультет Національного технічного університету «Харківський політехнічний інститут»
вул. Головна, 203А, Чернівці 58000

ВЗАЄМОДІЯ ДВОХ ТИПІВ ХЛОРОПЛАСТІВ ПРИ ФОРМУВАННІ ФОТОСИНТЕТИЧНОГО АПАРАТУ ВИСОКОПРОДУКТИВНИХ C₄ –РОСЛИН

Досліджено взаємодію хлоропластів клітин мезофілу та хлоропластів клітин обкладки провідних пучків листків генетичних форм кукурудзи, що відрізняються зерновою продуктивністю, на рівні синтезу макроергічних сполук та відтоку асимілятів до тканин флоєми. Показано можливість біохімічної та фізичної взаємодії органел клітини в процесі формування ФСА з високою функціональною активністю.

Ключові слова: кукурудза, C₄ – рослини, фотосинтетичний апарат (ФСА), «кооперативний фотосинтез», хлоропласти мезофілу, хлоропласти обкладки, асиміляти

Завдяки геніальному припущенню Родса (Rhoades) [18], а згодом дослідженнями Карпилова [5], було встановлено, що два типи клітин листка C₄ - рослин вміщують хлоропласти двох різних типів, які відрізняються як за ультраструктурою [16], так і за функціональною активністю [15]. З цієї причини зручною моделлю для вивчення фотосинтетичного забезпечення продукційного процесу є кукурудза (*Zea mays* L.) - типовий представник C₄ – рослин. На прикладі C₄ –типу рослин природа запропонувала механізм «кооперативного фотосинтезу», що передбачає взаємодоповнення різних механізмів засвоєння CO₂ та утворення високоенергетичних пластичних продуктів в межах одного рослинного організму і є, по всій ймовірності, основою його високої продуктивності. Два типи хлоропластів (фактично двома типами ФСА в межах одного організму), що просторово розмежовані в клітинах мезофілу листка та клітин обкладки провідних пучків доповнюють один другого і працюють в тісній «кооперації».

Попередніми нашими дослідженнями було показано, що при гібридизації на гетерозис в C₄–рослин має місце «кооперація» (взаємодія) окремих елементів ФСА на молекулярному та субмолекулярному рівнях [7, 8, 11]. Виходячи з сучасної уяви про те, що рослинний організм слід розглядати як динамічну неврівноважену систему, функціонування якої залежить від десятка підсистем та елементів, представляло цікавість вивчення взаємодії окремих підсистем ФСА на більш високих рівнях біологічної організації. Саме тому метою даної роботи було вивчення взаємозв'язку між двома типами хлоропластів на органному рівні та створення на цій основі можливої схеми їх кооперування в процесі формування ФСА рослин кукурудзи з високою функціональною активністю.

Матеріал і методи досліджень

Об'єктом дослідження служили проростки, в фазі появи другого листка, рослин кукурудзи різної генетичної природи (гомозиготні лінії, прямі та реципрокні комбінації простих міжлінійних гібридів та подвійні міжлінійні гібриди), що відрізнялися за врожайністю.

Для електронно-мікроскопічних досліджень висічки матеріалу фіксували впродовж 4 год. 6,5 % - ним глутаральдегідом на фосфатному буфері (рН 7,4), а потім в 2 % - ній осмієвій кислоті впродовж 6 год. Після дегідратації в серії спиртів і ацетоні рослинний матеріал поміщали в желатинові капсули і заливали сумішшю аралдиту і епону. Зрізи, отримані на ультрамікроскопі LKB 8800, контрастували цитратом свинцю і проглядали в електронному мікроскопі УЕМБ-100В та робили знімки на фотопластини. Порівняльному морфометричному аналізу по 8 параметрах (площа, розмір осей та ін.) піддавали по 50 хлоропластів кожної із досліджуваних форм кукурудзи (5 сіток x 10 хлоропластів) [9].

В основу схеми біохімічної взаємодії хлоропластів фотосинтезуючої клітини C₄–рослин покладено результати багаторічних досліджень, опублікованих нами в попередні роки [10-13].

Результати дослідів опрацьовані статистично, достовірність різниці між середньоарифметичними даними визначалася за критерієм Стьюдента при рівні значимості $p < 0,05$ [1].

Результати досліджень та їх обговорення

На органному рівнях вже має місце кооперація не окремих елементів ФСА, а двох типів ФСА, що є характерними для C_4 -рослин і сформувалися в процесі тривалої біохімічної еволюції як пристосування до умов існування. Ці два типи ФСА представлені двома типами хлоропластів клітин мезофілу та клітин паренхіми обкладки провідних пучків (ПП), що безпосередньо межують та контактують між собою (рис. 1). Хлоропласти мезофілу відносяться до хлоропластів гранального типу, де короткі стопки тилакоїдів об'єднані в єдиний мембранний комплекс при допомозі довгих тилакоїдів строми, що відомі ще під назвою «фрети».

Хлоропласти обкладки ПП лишні стопок (гран) тилакоїдів. Їх ламелярний апарат представлений тільки довгими тилакоїдами строми (матриксу), що пронизують внутрішній вміст хлоропласта. Зазначений структурний диморфізм хлоропластів знаходить своє відображення у функціональній ролі даних типів пластид. Це проявляється як в перетворення енергії кванту світла, так і фіксації вуглекислоти та утворення асимілятів. Хлоропласти мезофілу спеціалізуються, в основному, на концентруванні CO_2 та енергії у вигляді відновленого малату. В зв'язку з відсутністю активної форми ферменту РБФК в даному типі хлоропластів не відбувається відновлення поглинутого через продири листків CO_2 до вуглеводів. Цей процес проходить в хлоропластах обкладки ПП. При надходженні малату до хлоропластів ПП має місце декарбоксілування малату з утворення пірвинуградної кислоти (ПВК) та вивільнення енергії у вигляді відновленої форми НАДФН. В подальшому ПВК повертається до хлоропластів мезофілу, а вивільнені макроергічні сполуки надходять до циклу Кальвіна, де і відбувається відновлення вуглекислоти та утворення різних форм вуглеводів.

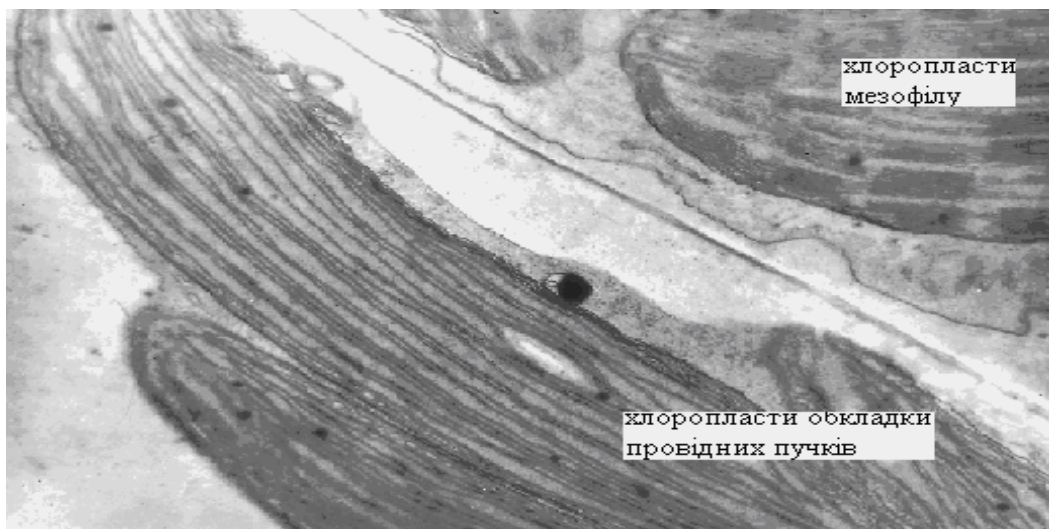


Рис.1. Фрагмент ультраструктури ділянки розмежування хлоропластів клітин мезофілу та паренхімних клітин обкладки провідних пучків (x 15000).

На фоні даної загальноприйнятої уяви про два типи ФСА в межах листка C_4 -рослин нами пропонується схема можливої «кооперації» хлоропластів мезофілу та обкладки ПП при формуванні високоактивного ФСА, що представлена на рис. 2.

У випадку створення ФСА високопродуктивних генетичних форм кукурудзи формування білоксинтезуючої системи супроводжується збільшенням гетерогенності геному та пластоми, що є результатом комплементативності генетичних систем вихідних батьківських форм.. При цьому має місце поєднання не тільки ядерних генетичних носіїв [2] але й рекомбінація пластоми гібридного організму [8, 11], про що свідчить поява в хлоропластній ДНК (хпДНК) високопродуктивних гібридів додаткової фракції частих повторів послідовностей нуклеотидів.

Збільшення гетерогенності хпДНК знаходить свою реалізацію шляхом синтезу білків на 70-S рибосомах хлоропластів. З'ясувалося, що формування супрамолекулярних комплексів хлоропластів мезофілу є більш залежним від лінкоміцину (ЛКМ) – інгібітору синтезу білків на 70-S рибосомах хлоропластів, тоді як ламелярний апарат хлоропластів обкладки ПП проявляє більшу чутливість до циклогексиміду (ЦГ) – інгібітору білкового синтезу на 80-S рибосомах цитоплазми. В першу чергу це стосується синтезу білків, молекулярною масою 43, молекулярною масою 43, 47 та 12 кДа. Синтез поліпептидів молекулярною масою 43 і 47 кДа знаходяться під контролем хпДНК, входять до складу реакційного центру фотосистеми II (РЦ ФС II) та локалізовані, в основному, в супрамолекулярних комплексах тилакоїдних мембран хлоропластів мезофільного типу [17]. Поліпептид молекулярною масою 12 кДа має також хлоропласт не походження та входить до комплексу ФС II та фактору спряження АТФ-ази. Його локалізація скоріш за все тилакоїдні мембрани обидвох типів хлоропластів. Таким чином, формування супрамолекулярного комплексу ФСА високопродуктивних генетичних форм кукурудзи є результатом тісної комплементатії геному та пластоми під взаємним контролем яких знаходиться синтез білкових компонентів (рис. 2).

Оптимізація структури ФСА шляхом його генетичного покращення супроводжується ростом функціональної активності процесів світлової та темної фаз фотосинтезу. Так, в хлоропластах мезофілу активуються процеси переносу електронів по електрон-транспортному ланцюгу (реакція Хілла), нециклічного фотофосфорилування (НЦФФ), утворення макроергічних сполук у вигляді НАДФН, пов'язані з роботою ФС II (рис. 2). На активацію роботи ФС II у високопродуктивних генетичних форм вказують також отримані нами дані по зростанню величини співвідношення змінної до фонові флуоресценції (F_p/F_0) при аналізі кривих індукції флуоресценції хлорофілу. Як відомо, саме даний показник характеризує функціональний стан реакційних центрів ФС II [3, 6]. Що стосується хлоропластів обкладки ПП, оскільки в них існують тільки тилакоїди строми (фрети), то для даного типу хлоропластів характерним є, в основному, процес циклічного фотофосфорилування із утворенням АТФ внаслідок перенесення електронів та протонів на фактор спряження від ФС I. Утворена АТФ використовується в циклі Кальвіна в процесі відновлення CO_2 до вуглеводів.

Підвищення гетерогенності хпДНК супроводжується підвищенням активності РБФК – основного ферменту темної фіксації CO_2 в циклі Кальвіна та цілого ряду ферментів вуглеводного обміну. Саме в хлоропластах обкладки ПП проходять реакції циклу Кальвіна, до яких задіяна РБФК. Оскільки в хлоропластах мезофілу відсутня активна форма РБФК [14], то цілком ймовірно, що підвищення активності ферменту РБФК у високопродуктивних генетичних форм кукурудзи слід віднести стовідсотково на рахунок хлоропластів обкладки ПП. Підвищення активності темної фіксації CO_2 в хлоропластах даного типу знаходить своє підтвердження в показниках часу напівзатухання флуоресценції ($\tau_{1/2}$), що були отримані шляхом аналізу кривих індукції флуоресценції хлорофілу.

З'ясувалося, що високопродуктивні генетичні форми кукурудзи, отримані в результаті вдалого підбору батьківських форм характеризуються також мінімальним часом напівзатухання флуоресценції ($\tau_{1/2}$). Даний показник активності ФСА у високопродуктивних форм проявляє надзвичайно високу чутливість до дії ХАФ, а отже знаходиться в значній мірі залежності від процесів трансляції на 70-S рибосомах хлоропластів. Тобто можна стверджувати факт підвищення автономії власної білоксинтезуючої системи органел у випадку формування високоактивного ФСА. Саме величина показника часу напівзатухання флуоресценції ($\tau_{1/2}$) характеризує на думку Краваєва [4], Корнеева [6], активність реакцій темного відновлення вуглекислоти та утворення метаболітів.

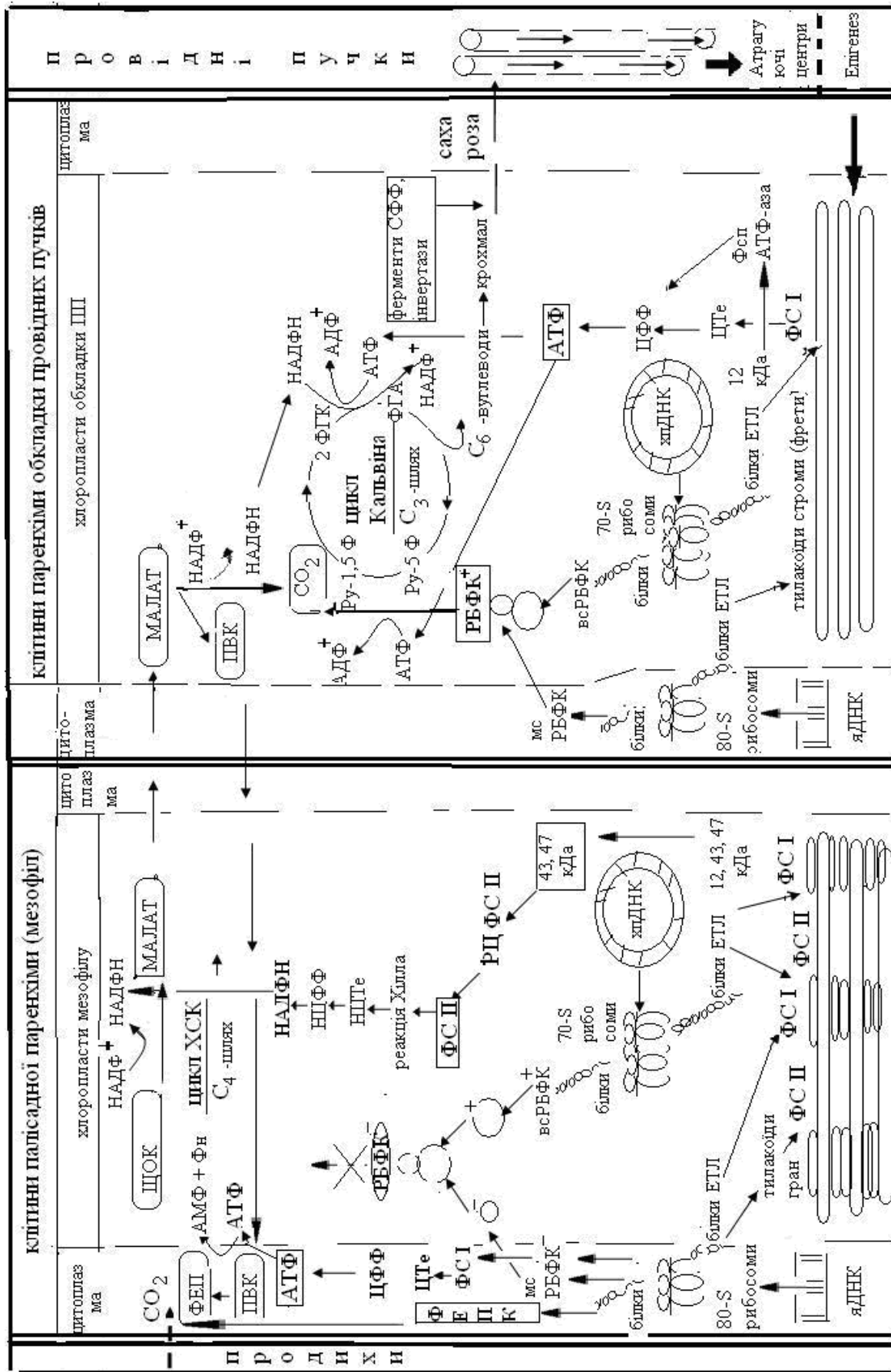


Рис. 2 Схема біохімічної взаємодії хлоропластів мезофілу та клітин обкладки проводних пучків при формуванні ФСА з високою функціональною активністю

Таким чином, на рівні листка (органному рівні) – основного асимілюючого органу рослини при формуванні ФСА C_4 – рослин з високою функціональною активністю має місце взаємодоповнення, свого роду «кооперація» хлоропластів двох типів: хлоропластів мезофілу та хлоропластів обкладки ПП. Фотосинтетичний апарат високопродуктивних генетичних форм кукурудзи характеризується з одного боку високою активністю ФС II та швидкістю перебігу процесів світлової фази фотосинтезу в хлоропластах мезофільного типу, а з іншої – підвищенням швидкості запуску реакцій циклу Кальвіна, що має місце в хлоропластах клітин обкладки ПП. Подібного роду переваги в перебігу та розмежуванні фотосинтетичних процесів можуть визначати продуктивність різних генетичних форм кукурудзи та зумовлювати прояв репродуктивного гетерозису в процесі гібридизації рослин.

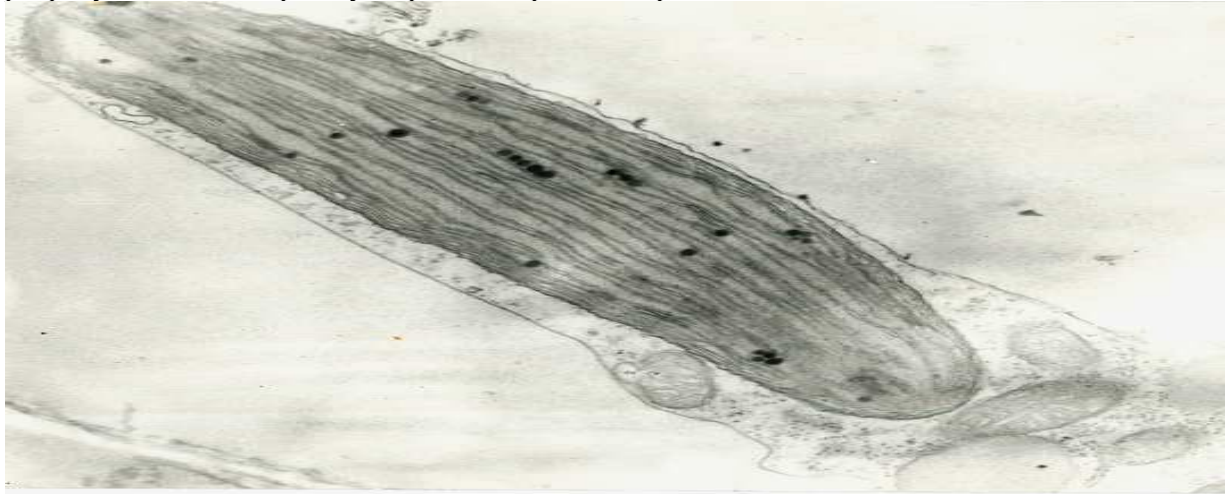


Рис. 3. Фрагмент ультраструктури хлоропласту обкладки провідних пучків в безпосередньому контакті з мітохондріями (x 15000).

Вузька спеціалізація хлоропластів двох типів створює переваги для високопродуктивних форм в засвоєнні променистої енергії Сонця шляхом синтезу макроергічних сполук та концентруванні CO_2 і його відновлення до вуглеводів. Утворені в хлоропластах обкладки ПП асиміляти зазнають метаболічних перетворень та утворюють менш рухомі форми у вигляді крохмалю. На відміну від низькопродуктивних генетичних форм кукурудзи (гомозиготних ліній) високопродуктивні генетичні форми (прості міжлінійні гібриди) характеризуються високим вмістом розчинних цукрів (редуючі цукри, сахароза) та здатні до підтримання ефективного балансу між транспортним та запасними формами вуглеводів. Цей баланс підтримується за рахунок активного функціонування ферментів крохмал-фосфорилази, сахарозо-фосфатсинтетази та нейтральної інвертази [12], що по всій ймовірності може бути наслідком підвищення автономії власної білоксинтезуючої системи хлоропластів.

Результати електронно-мікроскопічних досліджень показали, що окрім біохімічної «кооперації» хлоропластів мезофілу та клітин обкладки ПП при транспортуванні асимілятів має місце безпосередній фізичний контакт хлоропластів з іншими енергогенеруючими органелами рослинної клітини, зокрема мітохондріями. Так, в багатьох випадках, на препаратах, отриманих шляхом електронної мікроскопії, зафіксовано нагромадження довкола хлоропластів обкладки ПП скупчення мітохондрій (рис. 3). Слід зазначити, що в даній ситуації не спостерігається нагромадження гранул крохмалю в хлоропластах. Тобто можна говорити про свого роду рух органел клітини за хімічним градієнтом, подібно до того, як це має місце при руху одноклітинних організмів в поживному середовищі. За таких обставин в хлоропластах обкладки ПП активно проходять процеси вуглеводного обміну і не спостерігається нагромадження гранул крохмалю.

Висновки

Запропоновано схему біохімічної взаємодії хлоропластів клітин мезофілу та клітин обкладки провідних пучків в процесі формування фотосинтетичного апарату з високою функціональною

активністю. Показана можливість прямого фізичного контакту хлоропластів з іншими органелами фотосинтезуючої клітини.

1. *Афифи А.А.* Статистический анализ. Подход с использованием ЭВМ / А.А. Афифи, С.П. Эйзен.– М.: Мир, 1982. – 488 с.
2. *Алиев Р. Т.* Особенности генетического аппарата клеток и прогнозирование гетерозиса у гибридов растений: автореф. дисс. на соискание науч. степени д-ра биол. наук : спец. 03.00.15 «Генетика» / Р. Т. Алиев. – Харьков, 1989. – 40 с.
3. *Закирянов Ф. К.* О связи характерных времен переходных процессов с активностью темновых процессов фотосинтеза / Ф. К. Закирянов, В. А. Караваев, А. К. Кукушкин // Биофизика. – 1992. – Т. 37.- Вып. 2. – С. 219–221.
4. *Караваев В. А.* Медленная индукция флуоресценции листьев высших растений в различных условиях освещения в процессе роста / В. А. Караваев, А. К. Кукушкин // Физиол. раст. – 1985. – Т. 32. – С. 274–281.
5. *Карпилов Ю. С.* Особенности фотосистем хлоропластов клеток мезофила и паренхимы обкладок проводящих пучков листьев однодольных и двудольных растений / Ю. С. Карпилов // ДАН СРСР. – 1971. – Т. 197, № 2. – С. 480–483.
6. *Корнеев Д. Ю.* Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла / Корнеев Д. Ю. – Киев: Альтерпрес, 2002. – 188 с.
7. *Крылоу А. А.* Роля 70 і -80 S рыбасом у забезпеченні фотосинтезу актиносом хлоропластау гетерозисних гібридау кукурузы / А. А. Крылоу, А. Н., Ажгіревіч, Ю. Г. Масікевіч // Весці АН Беларусі. Сер. біял. навук, 1993. – № 3. – С. 25–28.
8. *Масікевич Ю. Г.* Исследование ядерно-цитоплазматической ДНК в связи с гетерозисом у кукурузы: автореф. дисс. на соискание учен. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.04 «Биохимия» / Ю. Г. Масікевич. – Минск, 1983. – 21 с.
9. *Масікевич Ю. Г.* Ультраструктура хлоропластов мезофила и обкладки гетерозисных гибридов кукурузы и их исходных форм / Масікевич Ю.Г., П.А. Орлов, В.Н. Решетников [и др.] // ДАН Беларусі. – 1993. – Т. 37, № 6. – С. 59–61.
10. *Масікевич Ю. Г.* Ядерно-цитоплазматична зумовленість світлових реакцій хлоропластів гетерозисних гібридів кукурудзи / Ю. Г. Масікевич // Вісн. Харків. нац. ун-ту ім. В.Н. Каразіна. Сер.: біол. – 2006. – Вип. 3. – № 729. – С. 100–104.
11. *Масікевич Ю. Г.* Структурно-функціональна комплементация елементів фотосинтетичного апарату як основа забезпечення прояву гетерозису в С – рослин: монографія / Ю. Г. Масікевич. – Чернівці: Зелена Буковина, 2008. – 264 с.
12. *Масікевич Ю. Г.* Вміст вуглеводів і активність ферментів вуглеводного обміну в проростках кукурудзи / Ю. Г. Масікевич // Наук. доп. Нац. ун-ту біоресурсів і природокористування України. - 2009. – 1(13).- <http://www.nbu.gov.ua/e-journals/nd/2009-1/09/mygtcs.pdf>.
13. *Масікевич Ю. Г.* Молекулярно-генетичні особливості хлоропластної білок синтезуючої системи в зв'язку з гетерозисом в кукурудзи / Ю. Г. Масікевич // Наук. вісн. Чернівецьк. ун-ту: Зб. наук. праць. – Вип. 455: Біологія. – Чернівці: Чернівецький національний ун-т, 2009. – С. 71–75.
14. *Bogorad L.* Genome organization and expression in plants / [L. Bogorad, S. O. Jolly, G. Kidd et al.]; by ed. C. J. Leaver. – New York, 1980. – 311 p.
15. *Hatch M. D.* C₄- photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure / M. D Hatch. // Biochim. Biophys. Acta – 1988. –Vol. 895. – P. 81–106.
16. *Miller K. R.* Organization of the photosynthetic membrane in maize mesophyll and bundle-sheath chloroplasts / K. R. Miller, G. J. Miller, K. R. Meintyre // Biochim. Biophys. Acta. – 1977. – Vol. 459. – P. 145–156.
17. *Picard Chr.* Maize heterosis affects the structure and dynamics of indigenous rhizospheric auxins-producing *Pseudomonas* populations / Chr. Picard, M. Bosco // FEMS Microbiology Ecology. – 2005. – Vol. 53 (3). – P. 349–357.
18. *Rhoades M. M.* Gene induced mutation of a heritable cytoplasmic factor producing male sterility in maize / M. M. Rhoades // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1950. – Vol. 30, № 1. – P. 634–643.

Ю.Г. Масикевич

Черновицкий факультет Национального технического университета
«Харковский политехнический институт»

**ВЗАЄМОДЕЙСТВИЕ ДВУХ ТИПОВ ХЛОРОПЛАСТОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ
ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ВИСОКОПРОДУКТИВНЫХ C₄ –РАСТЕНИЙ**

Исследовано взаимодействие хлоропластов клеток мезофилла и хлоропластов клеток обкладки проводящих пучков листьев генетических форм кукурузы, отличающихся зерновой продуктивностью, на уровне синтеза макроэргических соединений и оттока ассимилятов к тканям флоэмы. Показано возможность биохимического и физического взаимодействия органелл клетки в процессе формирования ФСА с високою функциональной активностью.

Ключевые слова: кукуруза, C₄ – растения, фотосинтетический аппарат (ФСА), «кооперативный фотосинтез», хлоропласты мезофилла, хлоропласты обкладки, ассимиляты

YU.G. Masikevych

Chernivtsy Faculty of National Technical University «Kharkiv Politechnical Institute», Ukraine

**INTERRELATION OF TWO TYPES OF CHLOROPLASTS AT THE FORMATION OF
PHOTOSYNTHESIS APPARATUS OF HIGHLY PRODUCTIVE C₄ – PLANTS**

The interrelation was investigated of the chloroplasts of the mesophyll cells and the chloroplasts of the cells of main bundles cover of leaves of genetic forms of corn, which differ by their grain productivity, at the level of synthesis of macroergic junctions and the outflow of assimilates to the tissues of a phloem. The possibility is shown of biochemical and physical interrelation of organelle of a cell in the process of formation PSA with highly functional activity.

Key words: corn, C₄ – plants, photosynthesis apparatus (PSA), “cooperative photosynthesis”, mesophyll chloroplasts, chloroplasts of cover, assimilates

Рекомендує до друку

Надійшла 6.01.2010

М.М. Барна

УДК 633.11:631.523:631.527.5

Р.В. РОЖКОВ

Харківський національний аграрний університет ім. В.В. Докучаєва
Харківська обл., Харківський р-н, п/в Комуніст-1, 62483

**ФОРМОТВОРЧИЙ ПРОЦЕС У ГІБРИДІВ ІНКОНГРУЕНТНИХ
СХРЕЩУВАНЬ ПОЛОНОЇДНИХ ПШЕНИЦЬ З СОРТАМИ
М'ЯКОЇ ТА ТВЕРДОЇ ПШЕНИЦЬ**

Проведений порівняльний аналіз формотворення в реципрокних комбінаціях польської пшениці з м'якою та пшениці Петропавлівського з твердою пшеницями, що розкриває філогенетичні зв'язки між цими видами. Показана перспективність створення генетично покращених форм м'якої та твердої пшениць шляхом їх схрещувань з видами-полоноїдами.

Ключові слова: міжвидова гібридизація, інконгруентні схрещування, види-полоноїди, *Triticum polonicum*, *T. petropavlovskyi*, морфологічні ознаки, елементи продуктивності, формотвірний процес

Інконгруентними називають схрещування, у яких батьківські форми мають повністю або частково не гомологічні набори хромосом, що спричиняє погану їх схрещуваність та/або стерильність гібридів [5]. Генетичний аналіз в інконгруентних схрещуваннях потребує