

С. П. СЫЧЕВА, З. М. ЭЙДЕЛЬМАН

## ВЛИЯНИЕ ЯДОВ ИНСЕКТИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ НА ФОТОФОСФОРИЛИРОВАНИЕ И РЕАКЦИЮ ХИЛЛА

(Представлено академиком А. И. Опариным 17 VI 1969)

Исследование действия различных веществ, нарушающих согласованную работу ферментативных систем и обмен веществ в клетке зеленых растений, сыграло большую роль в изучении механизма фотохимических реакций фотосинтеза. В частности, использование специфических ингибиторов в значительной степени способствовало выяснению механизма различных типов фотофосфорилирования и их сопряженности с транспортом электронов, источником которых являются гидроксилы воды или другие донорные системы.

При изучении реакций фотофосфорилирования многие авторы использовали яды, применяемые в исследованиях по окислительному фосфорилированию (<sup>1</sup>, <sup>6-9</sup>). Некоторые из этих веществ обладают гербицидным действием, другие являются антибиотиками. Влияние веществ инсектицидного действия до настоящего времени не исследовалось. Между тем их изучение представляет двойной интерес. С одной стороны, такие исследования имеют большое значение для познания механизма действия инсектицидов на защищаемое растение; с другой, — возможно, что их использование представит интерес для дальнейшего детального выяснения механизма реакций фотофосфорилирования.

Для исследования были взяты различающиеся по химическому строению инсектициды из группы хлор- и фосфорорганических. Линдан является  $\gamma$ -изомером гексахлорциклогексана. Из фосфорорганических препаратов исследованы метилмеркаптофос (О,О-диметил-О- $\beta$ -меркаптоэтилтиофосфат) и метилнитрофос (О,О-диметил-О-(3-метил-4-нитрофенил)-тиофосфат).

Горох сорта Грей-тукай выращивали в полевых условиях. Хлоропласты выделяли из верхних молодых листьев. Состав среды выделения: 0,4 М сахара, 0,01 М NaCl, 0,05 М трис-HCl pH 7,9 и бычий сероальбумин 0,2 мг в 1 мл среды выделения. Хлоропласты ресуспендировали в той же среде.

Для инкубации хлоропластов использовали прибор, описанный Эйделеман и Поповой (<sup>4</sup>). Источник света — две 300-ваттные лампы накаливания ЗН-8. Состав среды инкубации указан в подписях к рис. 1 и 2. Объем пробы 4 мл. Яды добавляли в среду инкубации в виде спиртовых растворов. Концентрации инсектицидов приведены при описании результатов. Содержание этанола не превышало 2%. По нашим данным, такая концентрация этанола не ингибирует фотофосфорилирования. Повторность опытов 5-кратная. Для каждого варианта 2—3 параллельные пробы.

Об интенсивности фосфорилирования судили по убыли фосфора после освещения. Фосфор определяли по Фиске-Суббарроу (<sup>3</sup>), а в реакционной смеси с феррицианидом — по Вейль-Малербе (<sup>2</sup>). Об интенсивности реакции Хилла судили по восстановлению феррицианида после освещения. Феррицианид определяли в депротенинизированном растворе на спектрофотометре СФ-4 при 420 м $\mu$ .

Изучение действия различных концентраций ядов проведено только для псевдоциклического фосфорилирования. Было установлено, что 50% ин-

ингибирование достигается для метилнитрофоса при концентрации  $7,5 \cdot 10^{-5}$  M, для линдана — при  $2 \cdot 10^{-4}$  M, для метилмеркаптофоса при  $5 \cdot 10^{-4}$  M.

Результаты изучения действия инсектицидов на различные типы фотофосфорилирования представлены на рис. 1.

Как видно из полученных данных, метилнитрофос следует отнести к наиболее токсичным ядам по отношению к типам фосфорилирования, которые сопряжены с реакциями фотоокисления воды, т. е. нециклическому и псевдоциклическому. Циклический тип ингибируется слабее.



Рис. 1

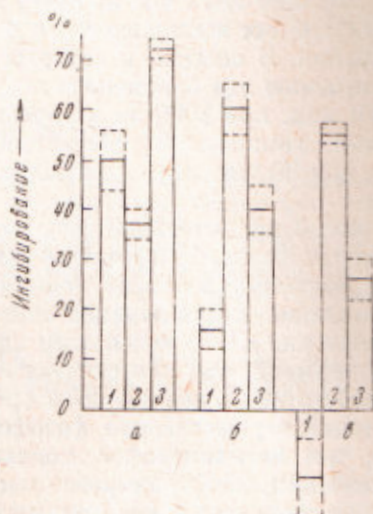


Рис. 2

Рис. 1. Влияние инсектицидов на фотофосфорилирование. а — метилнитрофос  $1,8 \cdot 10^{-4}$  M; б — линдан  $2 \cdot 10^{-4}$  M; в — метилмеркаптофос  $5 \cdot 10^{-4}$  M. 1 — нециклическое фосфорилирование, 2 — псевдоциклическое фосфорилирование, 3 — циклическое фосфорилирование. Условия реакции: освещение 10 мин. при 30 тыс. лк;  $t = 22^\circ$ ; газовая среда — воздух; среда инкубации (μмол — трис-HCl 80,  $K_2HPO_4$  14,  $MgCl_2$  10, NaCl 170, АДФ 2,5, АТФ 1, глюкоза 15, гексокиназа 0,3 мг. Кофакторы фосфорилирования: нециклического  $K_3Fe(CN)_6$  12, псевдоциклического ФМН 0,05 и циклического ФМС 0,1 μмол. pH среды 7,9. В пробе 50—70 μг хлорофилла. Уровень фосфорилирования в контроле (μмол. в час на 1 мг хлорофилла): с феррицианидом 250, с ФМН 520, с ФМС 700

Рис. 2. Влияние инсектицидов на реакцию Хилла и сопряженное нециклическое фосфорилирование. а — метилнитрофос  $1,8 \cdot 10^{-4}$  M; б — линдан  $2 \cdot 10^{-4}$  M; в — метилмеркаптофос  $5 \cdot 10^{-4}$  M. 1 — реакция Хилла, 2 — реакция Хилла в присутствии фосфат-акцепторной системы, 3 — нециклическое фосфорилирование. Условия реакции Хилла: освещение 6 мин. при 30 тыс. лк;  $t = 20^\circ$ ; среда инкубации (μмол трис-HCl 80,  $K_2HPO_4$  14,  $MgCl_2$  10, NaCl 170,  $K_3Fe(CN)_6$  12; pH смеси 8; содержание хлорофилла в пробе 80—100 μг. Условия нециклического фосфорилирования те же, что на рис. 1. Интенсивность реакции Хилла (μмол. феррицианида, восстановленного в час, на 1 мг хлорофилла): 350, в системе с акцепторами фосфата 580

Второй испытанный яд — линдан, в отличие от метилнитрофоса, является более сильным ингибитором циклического фотофосфорилирования и менее сильно подавляет два другие типа.

Меркаптофос, в концентрации в 2,5 раза большей, чем первые 2 яда, совсем не угнетает циклическое фосфорилирование, но заметно ингибирует псевдоциклическое и нециклическое.

Следует отметить, что метилнитрофос близок по токсичности для нециклического и псевдоциклического фосфорилирования к монурону — специфическому ингибитору кислородного звена фотосинтеза. По нашим дан-

ным,  $2 \cdot 10^{-4}$  М монурон подавляет нециклическое и псевдоциклическое фосфорилирование на 80—90%. Циклическое фосфорилирование, как это было показано Громе-Эльханан и Арноном<sup>(8)</sup>, угнетается монуроном в аэробных условиях только на 20—30%, а метилнитрофос ингибирует его наполовину.

Особенности действия линдана на разные типы фосфорилирования представляют большой интерес, однако неясно, с какими особенностями его химического строения это может быть сопряжено. Следует отметить, что разрушение этого яда на свету не может быть причиной меньшей токсичности его для нециклического и псевдоциклического типов фотофосфорилирования. В опытах, в которых создавались условия, способствующие фотоокислению яда (суспензию хлоропластов с трис-буфером и ядром освещали 10 мин. при 8000 лк в аэробных условиях, после чего добавляли остальные компоненты смеси для фосфорилирования и освещали еще 10 мин. при 30 тыс. лк), уменьшения токсичности линдана обнаружено не было.

На рис. 2 представлены результаты опытов по влиянию инсектицидов на реакцию Хилла. Полученные данные иллюстрируют ряд особенностей, характеризующих действие испытанных ядов. Метилнитрофос, наиболее сильно ингибирующий реакции нециклического фосфорилирования, оказался значительно менее токсичным для реакции Хилла, сопряженной с фосфорилированием, чем для синтеза АТФ. Этот яд угнетает реакцию Хилла и при отсутствии в реакционной среде фосфат-акцепторной системы, обеспечивающей осуществление фотофосфорилирования. Линдан значительно больше, чем метилнитрофос, подавляет реакцию Хилла, сопряженную с нециклическим фосфорилированием, и слабее ингибирует эту реакцию в отсутствие соединений, необходимых для синтеза АТФ. Метилмеркаптофос (в концентрации, в 2,5 раза большей, чем концентрация первых двух инсектицидов) оказывает на реакцию Хилла такое же действие, как линдан.

Сопоставление данных, полученных при анализе реакции Хилла, с результатами исследования нециклического фосфорилирования позволяет следующим образом охарактеризовать действие испытанных ядов на различные звенья сопряжения изученных фотосинтетических реакций. Метилнитрофос действует как своеобразный разобщитель двух исследованных фотохимических реакций, он сильнее ингибирует участки переключения свободной энергии на синтез АТФ, чем ступени транспорта электронов, сопряженные с фотоокислением воды. Линдан напротив, сильнее ингибирует реакцию фотоокисления воды, чем сопряженные с ней ступени синтеза АТФ при нециклическом фосфорилировании. Аналогичное действие оказывает метилмеркаптофос.

Представляет интерес тот факт, что в отсутствие фосфат-акцепторной системы оба последних яда незначительно ингибируют реакцию Хилла. Этот неожиданный результат находит, однако, подтверждение в работах авторов, изучавших другие яды. По данным Аврона и Шевита<sup>(9)</sup>, аналогичный результат был получен при изучении действия на фотохимические реакции бутилового эфира динодогидроксibenзойной кислоты, а по данным Кругманна, Ягендорфа и Аврона<sup>(10)</sup> — при исследовании динитрофенола и пентахлорфенола.

Причины большей чувствительности реакции Хилла к действию некоторых ядов (линдану, меркаптофосу и др.) в присутствии фосфат-акцепторной системы неясны, они требуют дальнейшего изучения.

Данные, обнаружившие, что метилнитрофос сильнее ингибирует синтез АТФ при нециклическом пути транспорта электронов и слабее — при циклическом, могут служить подтверждением предположений о различии участков синтеза АТФ при различных типах фосфорилирования.

Результаты, полученные при изучении действия линдана, иллюстрирующие более сильное ингибирование реакции Хилла по сравнению с со-

связанной с ней реакцией синтеза АТФ, можно истолковать следующим образом.

1. Возможно, что участок, где происходит синтез АТФ при нециклическом фосфорилировании, не лежит на пути электронов от воды к хлорофиллу, как это предполагает Арнон (5).

2. Вместе с тем можно допустить, что синтез АТФ на этапе переноса электрона от воды к хлорофиллу может быть обеспечен в достаточной мере и при частичном ингибировании реакции Хилла.

Ботанический институт им. В. Л. Комарова  
Академии наук СССР  
Ленинград

Поступило  
4 XI 1969

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> В. С. Коршунова, Т. Е. Кренделева, А. Б. Рубин, Биохимия, 32, 5, 980 (1967). <sup>2</sup> Г. Н. Никулина, Обзор методов колориметрического определения фосфора по образованию молибденовой сини, М.—Л., 1965. <sup>3</sup> В. П. Нилова, Тр. Всесоюз. н.-и. инст. защиты растений, 21, 2, 74 (1964). <sup>4</sup> З. М. Эйдельман, О. Ф. Попова, Сборн. Физиология травянистых растений, Душанбе, 1962, стр. 194. <sup>5</sup> D. J. Arnon, *Physiol. Rev.*, 47, 3, 347 (1967). <sup>6</sup> M. Avron, N. Shavit *Biochim. et biophys. acta*, 109, 2, 317 (1965). <sup>7</sup> H. Baltscheffsky, B. Arwidsson, *Biochim. et biophys. acta*, 65, 3, 425 (1962). <sup>8</sup> Z. Gromet-Elhanan, D. J. Arnon, *Plant Physiol.*, 40, 6, 1060 (1965). <sup>9</sup> S. Izawa, N. E. Good, *Biochim. et biophys. acta*, 102, 1, 20 (1965). <sup>10</sup> D. W. Krogmann, A. T. Jagendorf, M. Avron, *Plant Physiol.*, 34, 3, 272 (1959).