

Э. Е. ХАВКИН, А. И. ПЕРЕЛЯЕВА

**ФЕНИЛАЛАНИН-АММИАК-ЛИАЗА И НАКОПЛЕНИЕ
РАСТВОРИМЫХ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В РАСТУЩИХ
И ЗРЕЛЫХ КЛЕТКАХ КОРНЯ И КОЛЕОПТИЛЯ КУКУРУЗЫ**

(Представлено академиком М. Х. Чайлахяном 14 VIII 1969)

С синтезом фенилпропаноидных производных связано образование лигнина и растворимых фенольных соединений, которым отводится важное место в системе регуляции роста и развития растений (1-5). Усиление синтеза растворимых фенилпропаноидов и лигнификации во многих случаях сопоставимо с новообразованием ключевого фермента этого метаболического пути — фенилаланин-аммиак-лиазы (ФАЛ) (К.Ф.4.3.1.5) (5, 6). Если увеличение уровня ФАЛ приводит к накоплению эндогенных фенольных ингибиторов, то новообразование этого фермента может играть существенную роль в прекращении роста растяжением и переходе клетки

Таблица 1

Удельная активность ФАЛ в проростках кукурузы (указана квадратичная ошибка среднего)

| Орган | Фаза роста клетки | ФАЛ, $\mu\text{мол.}$ продукта* |
|------------|-----------------------------|------------------------------------|
| Корень | Деление (0—2 мм от кончика) | 55,0 \pm 0,9 |
| | Начало растяжения (2—4 мм) | 84,6 \pm 1,3 |
| | Конец растяжения (6—8 мм) | 76,0 \pm 6,0 |
| | Зрелость (12—14 мм) | 73,2 \pm 8,1 |
| Колеоптиль | Деление | 34,2 \pm 6,0 |
| | Растяжение | 41,2 \pm 4,1 |
| | Зрелость | 34,0 \pm 8,0 |

* В расчете на 1 мг белка за час.

в зрелое состояние. К сожалению, неизвестно, как изменяется активность ФАЛ и содержание фенольных соединений на последовательных этапах роста клеток. Настоящее сообщение призвано в какой-то степени заполнить этот пробел.

Мы сопоставили активность ФАЛ и суммарное количество растворимых фенолов в колеоптилях 2-, 4- и 7-дневных проростков кукурузы (фаза клеточного деления, растяжения и зрелости) и зонах роста корня 3-дневных проростков. Условия выращивания проростков и методы выделения и очистки растворимых белков были описаны ранее (7). Активность ФАЛ определяли по скорости образования транс-коричной кислоты (8), измеряя прирост поглощения при 290 м μ против контроля без субстрата в течение 1 часа при 25°. Растворимые фенольные соединения извлекали на холоду из растертого в жидком азоте материала двукратной обработкой 80% этанолом, содержащим 5% CH_3COOH , и определяли с реактивом Фолина — Чокальте (9). Калибровочную кривую готовили по тирозину.

Определение ФАЛ в зонах роста корня (табл. 1) показало, что удельная активность фермента увеличивается при переходе клеток от деления к росту растяжением и практически не изменяется в течение всего периода растяжения и сразу же после прекращения роста клеток. В колеоптилях уровень ФАЛ несколько ниже, чем в корне, максимум удельной активности фермента и в этом случае приходится на фазу клеточного растяжения*.

Учитывая количество растворимого белка, выделяемого из определенного числа колеоптилей или отрезков корня в каждом опыте, мы можем

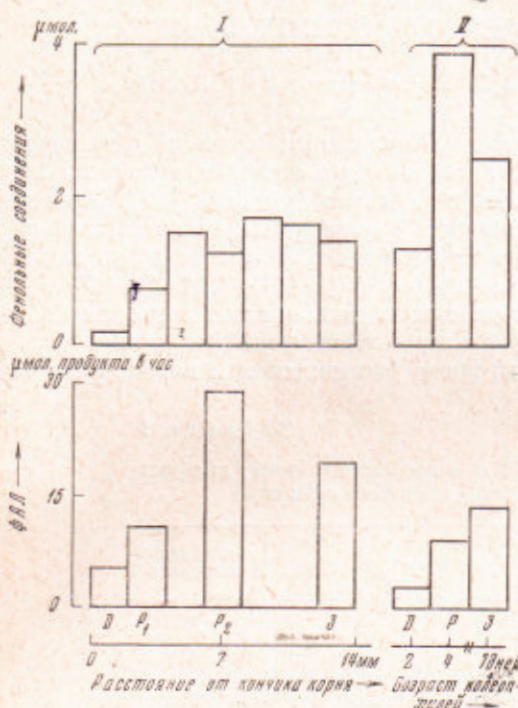


Рис. 1. Абсолютная активность ФАЛ и содержание фенольных соединений в клетках кончика корня (I) и колеоптиля (II) кукурузы (расчет на 10^6 клеток). Фазы роста клеток: Д — деление, Р — растяжение (P_1 — начальное растяжение, P_2 — формирование корневых волосков в корне), З — зрелость

концентрация этих веществ в ткани достигает $10^{-2} M$, т. е. значительно превышает концентрацию фенольных ингибиторов, угнетающую рост отрезков колеоптилей или изолированной растительной ткани (1, 2). Для прямого сопоставления концентрации фенолов в корне кукурузы с концентрациями, угнетающими рост интактного корня, мы провели опыты с коричной кислотой и ее производными (табл. 2). Оказалось, что только транс-коричная кислота в концентрации $10^{-3} M$ заметно подавляет рост корня. Замещенные производные коричной кислоты не были активны или стимулировали рост корня; дезаминирование экзогенного фенилаланина также не приводит к накоплению продуктов реакции до ингибирующего уровня.

Для более детального изучения действия транс-коричной кислоты на рост растяжением были поставлены следующие опыты. На корни 2-днев-

рассчитать абсолютную активность ФАЛ на колеоптиль (отрезок) или клетку. Полученные таким образом данные сопоставлены на рис. 1 с динамикой растворимых фенолов. В расчете на клетку максимальный уровень ФАЛ и фенолов достигается в конце фазы растяжения корня (в зоне формирования корневых волосков). В колеоптиле максимальное содержание фенолов также характерно для фазы растяжения, однако уровень ФАЛ увеличивается и после прекращения роста.

Таким образом, динамика потенциальной активности ФАЛ, измеренной в оптимальных для фермента условиях, согласуется с изменениями в содержании растворимых фенолов, накопление которых с прекращением роста в известной мере характеризует реальное увеличение активности ФАЛ за период клеточного растяжения.

Пересчет содержания фенольных соединений на количество воды в закончивших рост клетках корня и колеоптиля показывает, что общая

* Определение активности ФАЛ в колеоптилях проведено Н. Н. Варакиной.

ных проростков тушью наносили метки на расстоянии 2 и 4 мм от кончика. Проростки переносили в чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную 10^{-3} M раствором коричной кислоты. После 6 час. экспозиции в темноте измеряли длину корней и расстояние между метками, после чего определяли содержание белкового (спиртонерастворимого) азота и фенольных соединений в отрезках между метками (табл. 3). Угнетение роста растяжением на 75% сопровождается замедлением на 78% накопления белка и, по-видимому, сказывается на всем обмене веществ клетки. Уолтон (10), обнаруживший сильное подавление роста отделенной осевой

Таблица 2

Действие фенилаланина и фенилкарбоновых кислот на величину прироста корня проростков кукурузы за 24 часа (указана квадратичная ошибка среднего)*

| Вещество | Концентрация (M) | | | |
|------------------------|------------------|-------------|------------|-------------|
| | 0 | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} |
| Вода | 64 ± 9 | — | — | — |
| Фенилаланин | — | 68 ± 5 | 55 ± 5 | 67 ± 7 |
| Транс-коричная кислота | — | 35 ± 5 | 69 ± 6 | 52 ± 5 |
| Кофейная кислота | — | 72 ± 12 | 59 ± 8 | 56 ± 8 |
| Феруловая кислота | — | 66 ± 5 | 59 ± 6 | 56 ± 6 |
| Хлорогеновая кислота | — | 73 ± 12 | 59 ± 8 | 74 ± 10 |

* Исходная длина корня 2-дневных проростков $44,7 \pm 2,1$ мм.

части семян фасоли транс-коричной кислотой, также предполагает, что ее действие недостаточно специфично. Подавление роста и обмена веществ растягивающейся клетки транс-коричной кислотой не связано с заметным увеличением эндогенного содержания фенолов, определяемых с реактивом Фолина. По-видимому, за период растяжения экзогенная транс-коричная кислота, проникая в клетки корня, не успевает подвергнуться дальнейшим превращениям, и подавление роста корня следует отнести за счет действия именно этого соединения.

Хотя состав фенольных соединений в растениях кукурузы изучен недостаточно*, универсальное распространение фенолкарбоновых кислот позволяет предполагать, что производные коричной кислоты присутствуют и в исследованных нами тканях. В этой связи чрезвычайный интерес представляют данные о репрессии и ингибировании ФАЛ в сохраняющих способность к росту тканях растений при инкубации в 10^{-3} M растворах транс-коричной кислоты и ее производных (10, 14, 15). Новообразование ФАЛ усиливает синтез фенилпропанонидов, а накопление этих соединений должно угнетать фермент и затем прекращать его синтез. Весьма существенно, что при физиологической величине pH, субоптимальной для ФАЛ, степень ингибирования фермента транс-коричной кислотой резко увеличивается: в опытах с очищенным ферментом из клубней картофеля добавление $0,167$ M транс-коричной кислоты ингибировало ФАЛ на 22% при pH 8,8 и на 80% — при pH 6,6 (16). Эти наблюдения позволяют рассчитать уровни транс-коричной кислоты, необходимые для угнетения активности фермента (10^{-4} M) и репрессии синтеза ФАЛ (10^{-3} M).

* В листьях кукурузы найдены сложные эфиры *n*-кумаровой, кофейной и феруловой кислот (11). Судя по данным, полученным при хроматографии свободных аминокислот корня и колеоптиля (7, 12), фенилаланин не обнаруживается в этих органах в заметных количествах. Тирозин не был найден в колеоптилях, а в кончике корня эта аминокислота присутствует, начиная с зоны растяжения, но ее концентрация в ткани не превышает $4 \cdot 10^{-4}$ M. При величине K_m для ФАЛ растений кукурузы, равной $2 \cdot 10^{-4}$ — $7 \cdot 10^{-4}$ M (13), уровень фенилаланина должен заметно ограничивать скорость синтеза фенилпропанонидов.

Можно предположить, что начальные этапы синтеза фенилпропанов с участием ФАЛ и тирозин-аммиак-лиазы, присутствующей в тканях кукурузы и других злаковых⁽³⁾, представляют собой систему регулирования роста с довольно простой обратной связью. При накоплении фенилпропанов с ростингибирующей активностью выше некоторого критического уровня прекращается рост клеток и в корне начинается лигнификация. Эта гипотеза согласуется с представлениями Бардинской⁽¹⁾ о роли

Таблица 3

Действие транс-коричной кислоты (10^{-3} M) на растяжение клеток корня кукурузы и накопление в них белка (указана квадратичная ошибка среднего)*

| Вариант опыта | Длина отрезка между метками, мм | Содерж. N белк. мг на 100 отрезков |
|-----------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| Исходный контроль | 2 | 1071±62 |
| Контроль через 6 час. | 10±1,6 | 1554±95 |
| Опыт через 6 час. | 4±1,1 | 1176±83 |

* Исходная длина корня 2-дневных проростков $43 \pm 5,2$ мм.

промежуточных продуктов лигнинообразования в регулировании роста и развития растений. Однако такая модель не объясняет значительного разрыва во времени между прекращением роста и началом лигнификации в клетках корня кукурузы⁽¹⁷⁾. Как показала Обручева⁽¹⁸⁾, величина этого разрыва не зависит от скорости роста корня. Вероятно, растяжение и лигнификация корня регулируются разными системами, биохимическая связь которых осуществляется, быть может, на уровне ФАЛ.

Авторы благодарят профессора Ф. Э. Реймерса за внимание к работе и В. И. Кефели за советы при определении растворимых фенолов.

Сибирский институт физиологии
и биохимии растений
Сибирского отделения Академии наук СССР
Иркутск

Поступило
5 VIII 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. С. Бардинская, Растительные клеточные стенки и их образование, «Наука», 1964. ² В. И. Кефели, Р. Х. Турецкая, Усп. совр. биол., 57, 99 (1964). ³ А. С. Нейш, Биохимия фенольных соединений, 1968, стр. 234. ⁴ М. Н. Запрометов, Усп. совр. биол., 63, 380 (1967). ⁵ М. Н. Zenk, Ber. Dtsch. Bot. Ges., 80, 573 (1967). ⁶ Э. Е. Хавкин, Индуцированный синтез ферментов в процессах роста и морфогенеза растений, «Наука», 1969. ⁷ Э. Е. Хавкин, Н. Н. Варакина, Агробиология, № 12, 18 (1967). ⁸ M. Zucker, Plant Physiol., 40, 779 (1965). ⁹ T. Swain, W. E. Hillis, J. Sci. Food Agric., 10, 63 (1959). ¹⁰ D. C. Walton, Plant Physiol., 43, 1120 (1968). ¹¹ Т. А. Крупникова и др., ДАН, 180, 1497 (1968). ¹² Э. Е. Хавкин и др., Рост и клеточная дифференцировка растений, «Наука», 1967, стр. 85. ¹³ H. V. Marsh et al., Biochemistry, 7, 1915 (1968). ¹⁴ G. Engelsma, Planta, 82, 355 (1968). ¹⁵ M. Zucker, Plant Physiol., 43, 365 (1968). ¹⁶ E. A. Haver, K. R. Hanson, Biochemistry, 7, 1904 (1968). ¹⁷ Н. В. Обручева, ДАН, 185, 713 (1969). ¹⁸ Н. В. Обручева, ДАН, 185, 1178 (1969).