

А. А. ШАХОВ, В. А. ЗЕНЧЕНКО, М. Б. ЧУРИНА

**ФОТОСТИМУЛЯЦИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
ИЗОЛИРОВАННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПЕРОКСИСОМ**

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 23 IV 1971)

Изучение световых нефотосинтетических процессов является одной из проблем фотоэнергетики растений. В вопросе нефотосинтетического использования растениями энергии света особый интерес представляет познание влияния его на дыхание, которое ранее принято было считать независимым от действия света. Фотодыхание⁽¹⁾, стимуляция дыхания у.-ф. и и.-к. лучами^(2, 3), зависимость ультраструктуры митохондрий и их активности от спектрального состава видимого⁽⁴⁾, концентрированного^(5, 6), ультрафиолетового^(2, 7) и инфракрасного света⁽⁸⁾, а также наличие мембранной энергосистемы в зеленой клетке⁽²⁾ побудили нас допустить светочувствительность растительных пероксисом — цитоплазматических органелл, для которых характерно присутствие гликолатоксидазы, продуцирующей H_2O_2 , и каталазы. Предполагается участие пероксисом в фотодыхании зеленых листьев, где их роль заключается в окислении гликолата, образуемого хлоропластами^(1, 9-11). Согласно этой гипотезе, наличие фотодыхания на свету и отсутствие в темноте объясняется наличием или отсутствием гликолата.

Мы поставили задачу выяснить, не могут ли пероксисомы изменять свою активность под влиянием света. Препараты пероксисом из зеленых листьев для этой цели не годятся, так как современными методами очистить их полностью от осколков хлоропластов не удается⁽¹²⁾. Поэтому мы выделяли пероксисомы (глиоксисомы) из эндоспермов семян клецевины^(13, 14), не содержащих хлоропластов. Эндоспермы пророщенных в темноте семян растирали в среде, содержащей сахарозу (0,4 М), трис-буфер рН 7,5 (0,167 М), сывороточный альбумин (0,1%), КСl (0,01 М), ЭДТА (10⁻³ М), MgSO₄ (10⁻⁴ М). Из гомогената с помощью дифференциального центрифугирования выделяли сначала фракцию, осаждаемую между 500 и 10 000 g (центрифугирование 10 мин.) и состоящую из митохондрий, пероксисом и пропластид. Для разделения этих органелл осадок ресуспендировали в растворе сахарозы (32%) и ЭДТА (0,001 М), наплаивали на ступенчатый градиент сахарозы (растворы сахарозы 2,5; 2,3; 1,8; 1,5; 1,3 М с добавлением 0,001 М ЭДТА) и центрифугировали в градиенте плотности на ультрацентрифуге (25 000 об/мин) в течение 3 час. Пероксисомы скапливались на границе слоев 2,3 и 1,8 М. Все операции проводили при температуре 0—2°. Отсутствие митохондрий во фракции пероксисом устанавливали по ее неспособности окислять сукцинат в присутствии АДФ. Гликолатоксидазную активность определяли при 25° полярографически по поглощению кислорода в ячейке Шольда и Островского⁽¹⁵⁾ в реакционной среде, содержащей фосфатный буфер рН 8,2 (300 мкМ), флавиномононуклеотид (0,02 мкМ) и каталазу (3,3 мкг в 1 мл). Гликолат натрия применяли в концентрациях (20—200 мкМ) более низких, чем рекомендовано в литературе⁽¹⁴⁾, чтобы сделать реакцию его окисления лимитирующей. Среду продували воздухом (умеренная и низкая концентрация кислорода) или кислородом (повышенная концентрация кислорода). Суспензию пероксисом в ячейке освещали лампами

накаливания через водный фильтр для устранения инфракрасного излучения. Интенсивность облучения $3,7 \cdot 10^5$ и $4,7 \cdot 10^5$ эрг/см² в 1 сек. Активность гликолатоксидазы при освещении измеряли после стабилизации снижения силы тока в ячейке.

Полярограмма одного из типичных опытов изображена на рис. 1. По оси ординат отложена сила тока, пропорциональная концентрации кислорода. Как видно, без гликолата пероксисомы почти не поглощают кислорода. После добавления гликолата потребление кислорода их суспензиями становится значительным*. Следовательно, использование пероксисомами кислорода в основном связано

с окислением гликолата гликолатоксидазой. При освещении пероксисом окислительная активность их повышается, при затемнении — снижается. Из 14 опытов с активными (не менее 0,07 матома кислорода в темноте) суспензиями пероксисом при умеренной концентрации кислорода, не превышающей его растворимости на воздухе (0,09—0,26 мМ), в 13 случаях свет усиливал активность пероксисом (табл. 1). Согласно критерию знаков в вариационной статистике этот результат считается достоверным⁽¹⁶⁾. В среднем под влиянием света активность таких изолированных пероксисом увеличивалась на 28%. При действии света на инкубационную среду без пероксисом (т. е. в контрольных опытах) также наблюдалось некоторое снижение силы атома, которое, в эквивалентах кислорода, составляло $0,037 \pm 0,015$ матома кислорода и было гораздо меньшим, чем у среды с пероксисомами. Повышение поглощения кислорода пероксисомами при освещении с поправкой на инкубационную среду составляло $0,106 \pm 0,021$ матома кислорода и статистически достоверно (доверительная вероятность по Стьюденту 99,9%).

После кипячения (10 мин.) способность реагировать на свет у пероксисом (табл. 2) падает в среднем на $0,100 \pm 0,030$ матома кислорода, т. е. статистически достоверно (доверительная вероятность по Стьюденту > 99%). В то же время влияние света на прокипяченные суспензии пероксисом, хоть и немного больше, чем на инкубационную среду, но в пределах ошибки опыта. Следовательно, в результате кипячения пероксисомы практически утрачивают чувствительность к свету.

На малоактивные суспензии пероксисом (гликолатоксидазная активность в темноте < 0,07 матома кислорода) свет действует (табл. 1) несколько сильнее, чем на инкубационную среду, но гораздо слабее, чем на активные пероксисомы (с учетом поправки на инкубационную среду в 4,2 раза). Разница в светочувствительности активных и малоактивных пероксисом составляла $0,081 \pm 0,019$ матома кислорода и достоверна (доверительная вероятность по Стьюденту > 99,9%). У пероксисом с большой активностью возрастание чувствительности к свету с повышением их активности уже не столь сильное. По-видимому, в этих условиях лимитирующим становится не окисление гликолата, а другой процесс

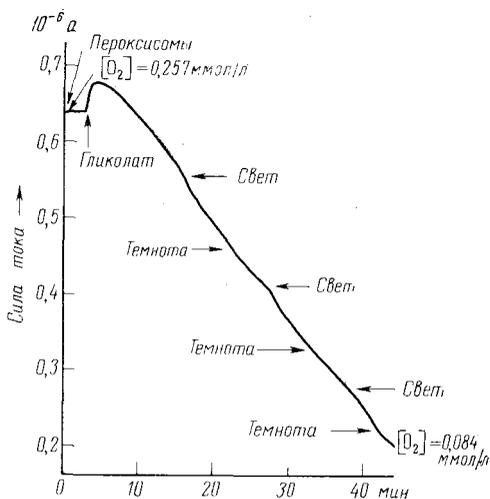


Рис. 1. Влияние попеременного включения и выключения света на гликолатоксидазную активность пероксисом

* Повышение силы тока в момент добавления гликолата объясняется отчасти внесением добавочного количества кислорода с холодным раствором.

Таблица 1

Влияние света на потребление кислорода активными и малоактивными суспензиями пероксисом при умеренной концентрации кислорода (матомы кислорода в 1 мл реакционной смеси за 1 час)

Продолжительность проращивания семян, дни	Средняя концентрация кислорода, мМ	Потребление кислорода		
		в темноте (контроль)	на свету	дополнительно на свету
Активные суспензии				
6	0,250	0,078	0,193	0,115
6	0,231	0,117	0,232	0,115
4	0,140	0,135	0,315	0,180
8	0,211	0,152	0,256	0,104
4	0,175	0,165	0,433	0,268
3*	0,191	0,275	0,272	-0,003
7	0,092	0,356	0,480	0,124
7	0,099	0,450	0,627	0,177
7	0,146	0,460	0,640	0,180
7	0,203	0,536	0,691	0,155
3	0,112	0,881	0,974	0,093
5	0,091	0,953	1,140	0,187
5	0,112	1,048	1,202	0,154
5	0,126	1,558	1,711	0,153
Среднее	—	0,512	0,655	0,143 ± 0,016
Малоактивные суспензии				
4	0,249	0	0,058	0,058
6	0,245	0	0,060	0,060
6	0,254	0	0,063	0,063
8	0,251	0	0,065	0,065
6	0,246	0	0,118	0,118
7	0,253	0,002	0,060	0,058
6	0,244	0,004	0,069	0,065
7	0,255	0,006	0,061	0,055
6	0,255	0,027	0,079	0,052
6	0,256	0,034	0,142	0,108
8	0,252	0,044	0,014	-0,030
5	0,199	0,058	0,132	0,074
Среднее	—	0,015	0,077	0,062 ± 0,010

* Фракции пероксисом и митохондрий плохо разделялись.

(может быть, диффузия кислорода в пероксисому). Таким образом, усиление окислительной активности пероксисом под действием света связано с гликолатоксидазой. Объяснить это можно тем, что гликолатоксидаза принадлежит к флавиновым соединениям, которые способны поглощать свет в видимой части спектра с образованием свободных радикалов⁽¹⁷⁾. Усиление дыхания листьев ряски светом наблюдается в области длин волн, близкой к максимуму поглощения у флавиновых соединений⁽¹⁸⁾.

Известно, что с повышением концентрации кислорода активность флавиновых оксидаз возрастает. При увеличении концентрации кислорода его поглощение пероксисомами в темноте также возрастает и усиливается стимулирующее влияние света (табл. 3). При малой (< 0,09 мМ) концентрации кислорода поглощение кислорода пероксисомами в темноте (в среднем 0,384 матомов) ниже, чем при умеренной (в среднем 0,512 матомов), а стимулирование светом в среднем отсутствует. Разница в действии света на пероксисомы при умеренной и низкой концентрациях кислорода (0,147 ± 0,057 матома кислорода) статистически достоверна (доверительная вероятность по Стьюденту > 95%). Для фотодыхания листьев установлена аналогичная зависимость от концентрации кислоро-

да (19). Полученные нами данные указывают на возможность участия пероксисом в фотодыхании растений.

Таким образом, гликолатоксидазная активность пероксисом (глиокси-сом), изолированных из эндоспермов прорастающих семян клещевины, повышается под влиянием освещения. Убитые кипячением пероксисомы утрачивают чувствительность к свету. Фотостимуляция гликолатоксидаз-

Т а б л и ц а 2

Дополнительное потребление кислорода прокипяченными суспензиями пероксисом на свету (матомы кислорода в 1 мл реакционной смеси за 1 час)

Продолж. проращивания семян, дни	Ср. конц. кислорода, мМ	Потребление кислорода *	Продолж. проращивания семян, дни	Ср. конц. кислорода, мМ	Потребление кислорода *
4	0,259	-0,059	8	0,222	0,067
4	0,253	0,015	8	0,176	0,094
4	0,234	-0,008	8	0,129	0,056
4	0,190	0,136	Среднее	—	0,043 ± 0,025

* С поправкой на силу тока в темноте.

Т а б л и ц а 3

Влияние света на потребление кислорода суспензиями пероксисом при повышении концентрации кислорода (матомы кислорода в 1 мл реакционной смеси за 1 час)

Продолж. проращивания семян, дни	Реакционная смесь продувалась	Ср. конц. кислорода, мМ	Потребление кислорода		
			в темноте (контроль)	на свету	дополнительное на свету
6	Воздухом	0,240	0,098	0,213	0,115
6	Кислородом	1,156	0,225	0,864	0,638
8	Воздухом	0,211	0,152	0,256	0,104
8	Кислородом	1,133	0,596	1,266	0,670

ной способности у активных в темноте пероксисом больше, чем у малоактивных. При повышении концентрации кислорода стимулирование светом гликолатоксидазной активности пероксисом усиливается, а при снижении ослабляется.

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева
Академии наук СССР

Поступило
22 IV 1971

МОСКВА
ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ W. A. Jackson, R. J. Volk, Ann. Rev. Plant Physiol., 21, 385 (1970). ² А. А. Шахов, Б. М. Голубкова, С. В. Шищенко, ДАН, 174, 1439 (1967). ³ А. А. Шахов, В сборн. Минеральное питание растений и фотосинтез, 3, Иркутск, 1970, стр. 188. ⁴ А. А. Шахов, Н. С. Балаур, ДАН, 186, 1206 (1969). ⁵ А. А. Шахов, Н. С. Балаур, В сборн. Светоимпульсная стимуляция растений, «Наука», 1971. ⁶ В. А. Зенченко, В сборн. Светоимпульсная стимуляция растений, «Наука», 1971. ⁷ А. А. Шахов, Б. М. Голубкова, ДАН, 194, 214 (1970). ⁸ Н. С. Балаур, А. А. Шахов, В сборн. Хлоропласты и митохондрии, «Наука», 1969, стр. 199. ⁹ N. E. Tolbert, A. Oeser et al., J. Biol. Chem., 243, 5179 (1968). ¹⁰ N. E. Tolbert, A. Oeser et al., Plant Physiol., 44, 135 (1969). ¹¹ N. E. Tolbert, R. K. Yamazaki, Ann. N. Y. Acad. Sci., 168, № 2, 325 (1969). ¹² R. K. Yamazaki, N. E. Tolbert, Biochim. et biophys. acta, 178, 11 (1969). ¹³ R. W. Breidenbach, H. Beever, Biochem. Biophys. Res. Commun., 27, 462 (1967). ¹⁴ R. W. Breidenbach, A. Kahn, H. Beever, Plant Physiol., 43, 705 (1968). ¹⁵ Х. Ф. Шольц, Д. Н. Островский, Лаб. дел., № 6, 375 (1965). ¹⁶ В. Ю. Урбах, Биометрические методы, «Наука», 1964. ¹⁷ A. de Kok, C. Veeger, Biochim. et biophys. acta, 131, 589 (1967). ¹⁸ J. Zurzycki, Acta Soc. Bot. Polon., 39, 485 (1970). ¹⁹ H. Fock, Biol. Zbl., 89, 545 (1970).