

УДК 541.144.7+581(132+174)

БИОФИЗИКА

Член-корреспондент АН СССР А. А. ШЛЫК, Н. Н. КОСТЮК

**ВЛИЯНИЕ δ -АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ
НА ВЫЗВАННОЕ ХЛОРАМФЕНИКОЛОМ ИНГИБИРОВАНИЕ
ТЕМНОВОГО НАКОПЛЕНИЯ ПРОТОХЛОРОФИЛЛИДА
В ЗЕЛЕННЫХ ЛИСТЬЯХ ЯЧМЕНЯ**

При действии хлорамфеникола на зеленеющие этиолированные листья одновременно с ингибированием синтеза белка значительно тормозится синтез хлорофилла (¹). Эффективность действия хлорамфеникола зависит от степени сформированности фотосинтетического аппарата (¹). Наличие метаболизма хлорофилла в течение всей жизни зеленого листа (²) поставило вопрос о значении белкового синтеза при этом процессе в уже сформировавшихся хлоропластах, где новые молекулы пигмента служат для поддержания его обновляющего фонда. Ингибирующее действие хлорамфеникола на хлорофиллообразование у зеленых растений отмечено как для вновь развивающихся листьев (³⁻⁵), так и для закончивших свое формирование (^{4, 6, 7}). Таким образом, и для этиолированных, и для зеленых растений найдено нарушение синтеза хлорофилла, связанное с ингибированием синтеза белка. Остается, однако, неясным, в какой мере существование при этом подавление образования ферментов, участвующих в синтезе хлорофилла (^{8, 9}), а в какой — ингибирование синтеза белкового носителя пигментов (^{10, 11}). Возможно также, что обе функции сопряжены в едином ансамбле в рамках несущих хлорофилл-синтазу центров биосинтеза (¹²). Одновременное использование хлорамфеникола и δ -аминолевулиновой кислоты (АЛК), синтез которой обычно лимитирует образование хлорофилла (^{8, 9, 13}), позволяет исследовать, не может ли ингибирование синтеза белка стать несущественным для метаболизма хлорофилла в условиях, когда растения снабжаются экзогенной АЛК и не нуждаются в соответствующем ферменте для построения этого предшественника тетрапирролов.

Растения ячменя выращивали под люминесцентными лампами ЛБ-30, создававшими освещенность 2000—3000 лк при чередовании световых и темновых периодов по 12 час. Половину растений в возрасте 5 дней помещали на раствор хлорамфеникола (100 мг/л), а оставшиеся продолжали выращивать в условиях водной культуры. Через 48 час. обе группы помещали корнями соответственно на содержащий или лишенный хлорамфеникола растворы АЛК (100 мг/л, т. е. 0,6 ммол/л), а часть растений оставляли на тех же средах без АЛК. Пробы сразу же переносили в полную темноту и через определенные промежутки времени фиксировали 2 мин. горячим паром (ни на какой стадии работы не применялся так называемый «безопасный» зеленый свет). Количество хлорофиллов а и b в этаноловых экстрактах находили спектрофотометрически по (¹⁴). Содержание протохлорофиллида определяли по отношению интенсивности его флуоресценции к флуоресценции хлорофилла при -196 по (¹⁵). Для анализа использовали 2 см первого листа, взятые на расстоянии 0,5 см от верхушки. В отдельных опытах, кроме того, анализировали нижние, прилегающие к колеоптилю, участки по 2 см. В этой связи следовало учесть, что угнетение роста под действием хлорамфеникола приводило к тому, что уже в момент затемнения длина первого листа была в среднем на 0,5 см

меньшей, чем в водном варианте. Чтобы улучшить взаимное соответствие анализированных участков, для помещения в темноту отбирали только проростки с листьями одинаковой длины (обычно по 7 см над колеоптилем).

На рис. 1 представлены результаты одного из типичных опытов, отражающие ход накопления протохлорофиллида зелеными растениями, находящимися на растворе хлорамфеникола или воде при их затемнении в

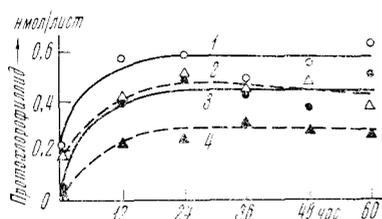


Рис. 1. Влияние хлорамфеникола на накопление протохлорофиллида при затемнении зеленых листьев ячменя в присутствии δ -аминолевулиновой кислоты (в расчете на один отрезок листа). 1 — верхние 2 см листа водного варианта, 2 — верхние 2 см листа хлорамфеникольного варианта, 3 — нижние 2-сантиметровые участки листа водного варианта, 4 — нижние 2-сантиметровые участки листа хлорамфеникольного варианта

подъему в содержании пигмента. Этот вид кривой говорит о наличии в растении внутренних факторов, останавливающих процесс даже при избытке такого ключевого предшественника, каким является АЛК. Очевидно, регулирование не сводится только к ее синтезу.

Т а б л и ц а 1

Содержание протохлорофиллида в верхних частях листьев растений водного и хлорамфеникольного (ХАФ) вариантов, подвергаемых затемнению на 24 часа без и с одновременной подкормкой АЛК

	В одном отрезке листа, 10^{-42} мол		По отношению к хлорофиллу а, μ мол/моль	
	Н ₂ О	ХАФ	Н ₂ О	ХАФ
Перед затемнением	38	33	0,34	0,34
После затемнения				
без АЛК	49	37	0,46	0,41
с АЛК	112	89	1,08	1,00
Прибыль в темноте				
без АЛК	11	4	0,42	0,07
с АЛК	74	56	0,74	0,66
Отношение прибыли к исходной величине, %				
без АЛК	29	12	35	21
с АЛК	195	170	218	194

Наблюдаемые закономерности раздельного и совместного влияния хлорамфеникола и АЛК на накопление протохлорофиллида количественно иллюстрируются в табл. 1 с помощью средних данных из восьми опытов. Содержание пигмента до затемнения статистически надежно различается при расчете на один отрезок листа. Кроме того, следует иметь в

виду, что у варианта с хлорамфениколом на 20 и 15% соответственно снижено и содержание хлорофиллов а и в. Поэтому и все эффекты в отношении протохлорофиллида должны быть расчленены на сопутствующие изменению количества хлорофиллов и непараллельные ему. Такое расчленение достигается с помощью сопоставления двух частей табл. 1. Действительно, при расчете по отношению к хлорофиллу а различия исходного уровня протохлорофиллида между вариантами исчезают. Отметим, что специальное изучение ⁽⁶⁾ показало даже некоторое повышение под влиянием хлорамфеникола содержания протохлорофиллида на свету, когда он представлен в основном неактивной формой, вероятно, лишенной необходимого белкового носителя.

Что касается количества протохлорофиллида, накапливаемого после затемнения, то оно снижается в присутствии хлорамфеникола не параллельно хлорофиллу и, хотя в расчете по отношению к хлорофиллу а различие между вариантами несколько меньше, чем по абсолютному содержанию в одном отрезке листа, оно отчетливо видно в обеих частях табл. 1. Это различие убедительно проявлялось и в других опытах. Так, кроме восьми опытов, лежащих в основе табл. 1, было проведено еще шестнадцать с 24-часовым затемнением в присутствии АЛК, средние величины из которых обнаружили накопление протохлорофиллида в водном варианте до уровня 95 ± 6 пикомол. в отрезке листа или $11,9 \pm 0,7$ ммоль на 1 моль хлорофилла а, а в хлорамфеникольном — соответственно 53 ± 4 пикомоля и $8,1 \pm 0,8$ ммоль на 1 моль хлорофилла а или в 1,8 и в 1,5 раза меньше, причем для каждого способа расчета статистическая вероятность случайного прохождения различий между вариантами оказалась меньшей, чем 0,001. Таким образом, снабжение АЛК не способно полностью снять эффект ингибирующего действия хлорамфеникола. Интересно, что наблюдаемая между вариантами разность количеств протохлорофиллида после затемнения по абсолютной величине даже больше в присутствии АЛК, чем без нее. Это соответствует и большему общему уровню накопления пигмента. Вместе с тем, по данным табл. 1 складывается впечатление, что степень ингибирования в присутствии АЛК несколько меньше. Такое сравнение правильнее делать на основе не суммарного содержания протохлорофиллида после затемнения, а его прибыли в темноте. В зависимости от способа выражения данных эта величина была снижена под действием хлорамфеникола до 36—58% по отношению к водному варианту в отсутствие АЛК и только до 76—89% при снабжении АЛК. Подобные значения получаются и на основе отношений темновой прибыли протохлорофиллида к его исходному уровню: степень ингибирования без АЛК составила 40—59% (как и в работе ⁽⁶⁾), а при снабжении АЛК — только 11—13%. Однако такое действие АЛК требует еще дальнейшего специального подтверждения и изучения.

Граник нашел, что в этиолированных листьях ячменя, обработанных 10 мМ раствором АЛК в течение 16 час., накапливается в 6—10 раз большее количество протохлорофиллида, чем в необработанных листьях ⁽¹³⁾. Это было позднее подтверждено другими авторами ⁽⁸⁾. Санквист при введении 5 мМ раствора АЛК нашел десятикратное максимальное увеличение содержания пигмента у этиолированных пшеничных листьев ⁽¹⁷⁾. Результаты, полученные нами, показывают, что и в закончившей рост ткани зеленых растений ячменя под действием АЛК происходит значительное усиление темнового накопления протохлорофиллида. Прирост количества пигмента за 24 час. затемнения в присутствии АЛК превышает наблюдаемый без АЛК в 6—7 раз в водном варианте и в 9—14 раз в хлорамфеникольном. При этом следует учесть, что используемая нами концентрация АЛК была на порядок меньше, чем у вышеуказанных авторов. Таким образом, данные о темновом накоплении протохлорофиллида при введении АЛК в зеленые растения хорошо согласуются с результатами, полученными на этиолированных листьях.

Гассман и Богорад⁽⁸⁾ нашли, что ингибирующее действие хлорамфеникола на образование хлорофилла в срезанных этиолированных бобовых листьях может быть частично снято при введении АЛК. Полученный эффект интерпретируется авторами как отражение необходимости регенерации лабильного фермента для синтеза АЛК. По аналогии с синтезом АЛК в клетках животных Надлер и Граник⁽⁹⁾ предполагают, что фермент для синтеза АЛК может быть закодирован в ядерном гене и синтезируется в цитоплазме, а затем переносится к митохондриям и пластидам. Хлорамфеникол, по их мнению, может ингибировать синтез какого-то белка в пластиде, который требуется для транспортировки и локализации энзима в пластиде. Могут быть, однако, и другие взаимоотношения между белками внутри- и внепластидного происхождения. Образование относительно больших количеств хлорофилла при освещении этиолированных листьев, подкормленных АЛК^(9, 17, 18), говорит о том, что белок голохрома, участвующий в фотовосстановлении протохлорофиллида в хлорофилл, не является в условиях опытов этих авторов лимитирующим звеном хлорофиллообразования. Кирк считает⁽¹⁴⁾, что эффект ингибиторов белкового синтеза сказывается исключительно на образовании белка голохрома. Полученные нами данные при работе с зелеными растениями показывают, что ингибирующее действие хлорамфеникола, хотя и уменьшается в присутствии экзогенной АЛК, но его влияние продолжает сказываться, отражаясь на уровне накопления протохлорофиллида. Следовательно, АЛК не может полностью снять действие антибиотика. Если бы было верным предположение об ингибировании хлорамфениколом только формирования белка (или белков), требуемого для синтеза АЛК, то следовало бы ожидать полного устранения его влияния в случае введения АЛК. Установленный выше факт торможения хлорамфениколом хлорофиллообразования, идущего за счет избыточной АЛК, отклоняет такую трактовку и указывает на значение ингибирования биосинтеза и иных, по всей вероятности структурных, белков в частности белка — носителя пигмента.

Лаборатория биофизики и изотопов
Академии наук БССР
Минск

Поступило
23 VIII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. M. Margulies, *Plant Physiol.*, **37**, 473 (1962). ² А. А. Шлык, *Метаболизм хлорофилла в зеленом растении*, Минск, 1965. ³ Ю. Г. Молотковский, А. М. Смирнов, *Физиол. раст.*, **10**, 325 (1963). ⁴ О. П. Осипова, М. К. Николаева, Х. Я. Хейн, *Физиол. раст.*, **14**, 240 (1967). ⁵ М. К. Николаева, О. П. Осипова, Ю. В. Крылов, *ДАН*, **175**, 487 (1967). ⁶ А. А. Шлык, Г. Е. Савченко и др., *ДАН*, **188**, 748 (1969). ⁷ М. К. Николаева, М. П. Власова, О. П. Осипова, *Физиол. раст.*, **17**, 5 (1970). ⁸ M. Gassman, L. Bogorad, *Plant. Physiol.*, **42**, 774 (1967). ⁹ K. Nadler, S. Granick, *Plant. Physiol.*, **46**, 240 (1970). ¹⁰ J. T. O. Kirk, R. L. Allen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **21**, 523 (1965). ¹¹ J. T. O. Kirk, *Planta*, **78**, 200 (1968). ¹² А. А. Шлык, I. V. Prudnikova et al., *Progress in Photosynthesis Research*, **11**, 572 (1969). ¹³ S. Granick, *Plant Physiol.*, **34**, XVIII (1959). ¹⁴ J. F. Wintermans, A. de Mots, *Biochim. biophys. acta*, **109**, № 2, 448 (1965). ¹⁵ А. А. Шлык, Г. Е. Савченко, Н. Г. Аверина, *Биофизика*, **14**, 119 (1969). ¹⁶ F. Hoffman, G. Walter, *Biologisch. Zbl.*, **89**, 2 (1970). ¹⁷ C. Sundqvist, *Plant. Physiol.*, **22**, 147 (1969). ¹⁸ M. Gassman, L. Bogorad, *Plant. Physiol.*, **42**, 781 (1967).