

УДК 541.144.7

БИОХИМИЯ

Л. Г. КУЗНЕЦОВА, В. С. ПОЛЕВАЯ, Н. Г. ДОМАН

О ФИКСАЦИИ $C^{14}O_2$ ИЗОЛИРОВАННЫМИ ТКАНЯМИ РАСТЕНИЙ

(Представлено академиком А. И. Опариным 4 I 1971)

В последние годы возрос интерес к культурам изолированных тканей растений как одной из модельных систем для изучения механизма фотосинтеза. Рядом исследователей было показано, что многие ткани при выращивании в культуре *in vitro* зеленеют и становятся способными к усвоению углекислоты и образованию типичных продуктов фотосинтеза (¹⁻³). Но энзимологическая сторона процесса усвоения углекислоты тканями растений в культуре фактически не исследовалась, и поэтому сущность процесса еще не раскрыта. Задачей настоящей работы является выяснение особенностей поглощения $C^{14}O_2$ тканями табака, культивируемыми *in vitro*.

Объектом исследования служила культура ткани стебля табака *Nicotiana glauca*, изолированная в 1967 г. Р. Г. Бутенко. Ткани выращивали в кондиционированных камерах на свету (люминесцентные лампы дневного света, интенсивность света 2500—3000 лк, продолжительность освещения 16 час).

Ткани выращивали на агаризованной питательной среде (минеральные соли по Мурасиге и Скугу (⁴) с добавками гидролизата казеина (1000 мг/л), тиамина (0,4 мг/л), мезоинозита (50 мг/л), кинетина (1 мг/л), АНУ (1 мг/л)) в присутствии сахарозы (3000 мг/л) в течение 21 дня (I вариант) или только 14 дней, а последующие 7 дней ткани культивировали на среде, не содержащей сахарозу (II вариант).

При проведении опытов с $C^{14}O_2$ кусочки тканей весом 1—1,2 г помещали в камеру (концентрация $C^{14}O_2$ 0,4%, 10 μ C/мл, освещенность 8000—9000 лк, $t = +23 - 25^\circ$ (⁵)). Материал после экспозиции фиксировали кипящим 80% этанолом. Дальнейший анализ материала проводили по описанной методике (⁶). Хроматографическое разделение спирто-водорастворимой фракции проводили на бумаге FN-15 в системе растворителей: этанол — аммиак — вода (80 : 4 : 16) и бутанол — метанол — этанол — муравьиная кислота — вода (30 : 30 : 36 : 5 : 20). Идентификацию соединений проводили по методу комбинированного проявления соединений различных классов (⁷).

Для определения активности рибулозодифосфаткарбоксилазы РДнФ и фосфопируваткарбоксилазы ФП свежую ткань растирали в буфере трис-HCl 0,1 M pH 7,8, содержащем аскорбиновую кислоту, $MgCl_2$, меркаптоэтанол и капроновый порошок (для связывания фенолов и пигментов) (^{8, 9}). Полученный гомогенат отжимали через несколько слоев полотна, центрифугировали в течение 10 мин., 11 000 об/мин. Фракции белков РДнФ и ФП-карбоксилаз высаливали 60% насыщением $(NH_4)_2SO_4$, осадок после центрифугирования ресуспендировали в трис-HCl-буфере 0,1 M, pH 7,8, для стабилизации ферментов добавляли $MgCl_2$, восстановленный глутатион и проводили 10 час. диализ против того же буфера 0,01 M.

Ферментная смесь для определения активности рибулозодифосфаткарбоксилазы (К.Ф.4.1.1.39) содержала в 1 мл: 50 μ M $NaH^{14}CO_3$, 10 μ M $MgCl_2$, 10 μ M восстановленного глутатиона, 0,2—0,3 мг белка, 0,5—1 μ M

рибулозо-1,5-дифосфата *, буфер трис-HCl, 0,1 М, рН 7,8 или $\frac{1}{15}$ М фосфатный буфер, рН 7,8 (¹⁰).

Ферментная смесь для определения активности фосфопируваткарбоксилазы (К.Ф.4.1.1.31) содержала в 1 мл: 10—30 μ М NaHC¹⁴O₃, 10 μ М MgCl₂, 10 μ М восстановленного глутатиона, 3,6 μ М фосфопирувата, НАДН₂ 0,2 μ М, 1—2 мг белка, буфер трис-HCl 0,1 М, рН 7,6 или $\frac{1}{15}$ фосфатный буфер рН 7,6 (¹¹).

Изучаемый нами штамм культуры ткани табака на свету зеленеет, в тканях синтезируется хлорофилл а и b (0,53 мг хлорофилла на 1 г сухого вещества ткани). Данные

Т а б л и ц а 1
Поглощение C¹⁴O₂ тканями табака (μ М СО₂ на $\frac{1}{2}$ мг белка)

Вариант выращивания	Время экспозиции в атмосфере C ¹⁴ O ₂ , сек.	Световая фиксация	Темновая фиксация
I	2	0,1·10 ⁻²	0,045·10 ⁻²
	15	0,41·10 ⁻²	—
II	300	5,2·10 ⁻²	1,1·10 ⁻²
	300	7,0·10 ⁻²	1,7·10 ⁻²

по интенсивности роста тканей табака при различных условиях культивирования следующие. Для I варианта выращивания сырой вес на свету составлял $12,4 \pm 1,3$ г, для II варианта он был равен $7,2 \pm 0,6$ г, но при культивировании тканей в темноте для II варианта сырой вес составлял $2,7 \pm 0,2$ г.

Результаты опытов по изучению интенсивности фиксации C¹⁴O₂ тканями табака в культуре in vitro, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что световая фиксация C¹⁴O₂ значительно превышает темновую. Количество поглощенного C¹⁴O₂ непрерывно возрастает с увеличением времени экспозиции, и, хотя это возрастание отклоняется от пропорционального в 2—3 раза, по-видимому вследствие завышенной концентрации углекислоты, тем не менее указанное отклонение может быть признано вполне физиологическим.

95—97% всего ассимилированного C¹⁴ находится в спирто-водорастворимой фракции.

Как видно из табл. 2, основными продуктами как световой, так и темновой фиксации углекислоты тканями, выращенными на сахарозе, являются органические кислоты (74—80% включения C¹⁴). При фиксации углекислоты тканями, переведенными на культивирование в бессахарозную среду (II вариант выращивания), более 40% меченого углерода включается в фосфорные эфиры сахаров и фосфоглицериновую кислоту.

Качественный состав продуктов световой фиксации C¹⁴O₂ тканями более разнообразен, чем темновой. В тканях, экспонированных на свету, обнаружены такие характерные продукты фотосинтетического усвоения углекислоты как фосфорные эфиры сахаров, аланин, серин, глицин. Появление меченых фосфорных эфиров сахаров при темновой фиксации C¹⁴O₂ тканями табака, по-видимому, связано с превращениями фосфопирувата (глюконеогенез), в который может попасть метка C¹⁴.

Определение главнейших карбоксилирующих ферментов показало наличие рибулозодифосфаткарбоксилазы и фосфопируваткарбоксилазы, причем активность второго фермента (для I варианта $8,3 \cdot 10^{-3}$, для II варианта $7,9 \cdot 10^{-3}$ μ М СО₂ в минуту на 1 мг белка) значительно преобладает над активностью первого фермента (для I варианта $4,4 \cdot 10^{-3}$, для II варианта $2,7 \cdot 10^{-3}$ μ М СО₂ в минуту на 1 мг белка).

Сопоставление данных табл. 1 и данных активностей РДиф- и ФП-карбоксилаз указывает на то, что примерно 5-кратное превышение световой фиксации C¹⁴O₂ над темновой не может быть обеспечено работой рибулозодифосфаткарбоксилазы, а должно быть связано главным образом с рабо-

* Препарат рибулозо-1,5-дифосфата был получен по способу, разработанному в Институте биохимии им. А. Н. Баха АН СССР.

Таблица 2*

Состав продуктов световой и темновой фиксации $C^{14}O_2$ тканями табака

Условия опыта	Варианты выращивания	Время экспозиции в атмосфере с $C^{14}O_2$, сек.	% включения C^{14} от общей радиоактивности						
			фосфорные эфиры сахаров, ФГК	аспарагиновая кислота	яблочная кислота	лимонная кислота	аланин	глутаминовая кислота	серин+глицин
Свет	I	2	16,4	19,5	64,0	Сл.	—	—	—
		60	12,3	16,1	54,9	16,7	Сл.	—	—
Темнота	II	300	8,6	9,4	60,4	13,8	4,7	3,2	—
		300	42,8	23,7	9,8	10,9	6,2	—	6,3
		300	6,7	12,6	74,0	6,6	—	—	—

* Перед экспозицией ткани предварительно выдерживали в темноте в течение часа.

той фосфофруктокарбоксилазы. Об этом же свидетельствует и состав образующихся ранних продуктов фиксации $C^{14}O_2$ (табл. 2).

Следовательно, пока система фиксации CO_2 на рибулозо-1,5-дифосфате у культур тканей табака сформирована еще не полностью, фиксация углекислоты на фосфофруктокарбоксилазе усиливается за счет энергии света, поглощенной хлоропластами.

Известно, что у растений, осуществляющих ассимиляцию CO_2 по циклу Кальвина, система карбоксилирования на фосфоэнолпирувате локализована в цитоплазме. Можно предположить, что и в зеленеющих на свету культурах ткани табака это также имеет место и световая энергия, превращаясь в энергию химических связей, мигрирует из хлоропластов в цитоплазму, принимая участие в процессе ассимиляции углерода.

Таким образом, кинетика и состав продуктов световой фиксации $C^{14}O_2$, присутствие в зеленых тканях ферментов — рибулозодифосфаткарбоксилазы и фосфофруктокарбоксилазы позволяют говорить о наличии в тканях двух возможных путей первичного карбоксилирования.

Значительное превышение световой фиксации $C^{14}O_2$ над темновой, более высокая активность фосфофруктокарбоксилазы и состав образуемых продуктов свидетельствуют о том, что исследуемая нами культура тканей табака и культивировании ее на среде с сахарозой обладает гетеротрофным типом обмена веществ.

Присутствие активной рибулозодифосфаткарбоксилазы в ткани указывает на способность культуры тканей табака на свету усваивать углерод автотрофно, о чем свидетельствуют и данные по росту тканей.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
11 XII 1970

Институт фотосинтеза
Академии наук СССР
Пушино-на-Оке

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ L. Bergmann, *Planta*, **74**, 243 (1967). ² I. McLaren, D. R. Thomas, *New Phytol.*, **66**, 683 (1967). ³ G. Corduan, *Planta*, **91**, 291 (1970). ⁴ T. I. Murasige, F. Skoog, *Physiol. Plant*, **15**, 473 (1962). ⁵ Н. Г. Доман, А. К. Романова, З. А. Терентьева, Сборн. Физиология питания, роста и устойчивости растений Сибири и Дальнего Востока, Изд. АН СССР, 1963, стр. 116. ⁶ А. Т. Мокроносов, Н. А. Бубенщикова, *Физиол. раст.*, **8**, 5 (1961). ⁷ Н. Г. Доман, *Тр. комиссии аналитической химии*, **6** (9), 452 (1955). ⁸ G. Sanderson, *Biochim. et biophys. acta*, **92**, 622 (1964). ⁹ Г. А. Бузун, К. М. Джемухадзе, Л. Ф. Милешко, *Прикл. биохим. и микробиол.*, **2**, в. 5 (1966). ¹⁰ А. К. Романова, И. Я. Веденина, Н. Г. Доман, *Изв. АН СССР*, **3**, 363 (1968). ¹¹ А. К. Романова, А. Н. Ножевикова и др., *Микробиология*, **39**, в. 6, 1970.