

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Т. В. ЛИХОЛАТ, Е. В. МОРОЗОВА

**ВЛИЯНИЕ АУКСИНА НА ПРОЦЕСС ОКИСЛИТЕЛЬНОГО
ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В КЛЕТКАХ КОЛЕОПТИЛЕЙ ПШЕНИЦЫ
РАЗНОГО ВОЗРАСТА**

(Представлено академиком М. Х. Чайлазяном 28 XI 1971)

В настоящее время хорошо установлен факт тесной сопряженности роста организмов с процессами генерирования энергии, происходящими в их клетках, с другой стороны известно, что рост растений регулируется фитогормонами (¹⁻⁴). В связи с этим особый интерес приобретает вопрос о влиянии регуляторов роста растений на обмен энергии растительного организма.

В литературе имеются указания, что фитогормоны, как ауксины, так и гиббереллины, влияют на образование богатых энергией фосфорных связей (⁵⁻⁷). В наших предыдущих исследованиях (⁸) было показано, что регуляторы типа ауксина повышают сопряженность окисления и фосфорилирования в митохондриях, причем это влияние зависит от концентрации и вида растений. В последнее время все больше накапливается данных, что действие фитогормонов, и в частности ауксина, зависит от возрастного состояния клетки. Как известно, энергетический обмен клеток разного возраста различен (^{9, 10}). В задачу настоящей работы входило выяснение влияния ауксина — β -индолилуксусной кислоты (ИУК) на окислительную и фосфорилирующую активность митохондрий, выделенных из клеток, находящихся на разных фазах роста. Удобной моделью для подобных исследований являются coleoptiles злаков разного возраста, так как в них фазы роста клеток хорошо разграничены во времени.

Объектом исследования являлись coleoptiles пшеницы сорта «Минская», клетки которых находились в фазе деления (42 часа) и в фазе растяжения (72 часа со времени намачивания семян). Семена пшеницы тщательно промывались содой и отмытые водой раскладывались в кюветы. Контрольные растения выращивались на воде, опытные — на растворах ИУК (0,5 мг/л). Через 42 и 72 часа после замачивания семян coleoptiles пшеницы освобождались от листа и использовались для анализа.

Выделение митохондрий из coleoptiles проводилось по методике, описанной в работе Сисакяна и Калачевой (¹¹). Предварительно охлажденные coleoptiles по 10 г растирались в охлажденной ступке в среде выделения, содержащей сахарозу 0,5 мол/л, К-фосфатный буфер $2/15$ мол/л, рН 7,5 и 0,1% раствор альбумина. Во время получения гомогената рН поддерживался на уровне 7,4—7,5 добавлением КОН, гомогенат отжимался через парашютный шелк и центрифугировался при 10 тыс. об/мин 10 мин. на рефрижераторной центрифуге ЦЛР-1; супернатант центрифугировался при 18 тыс. об/мин, 20 мин. Осадок митохондрий суспендировался в 0,5 М сахарозе. Все процедуры выделения митохондрий проводились при 0—2° в холодной комнате КХР-1. Поглощение O_2 учитывалось манометрически на аппарате Варбурга в течение 30 мин. (¹²), фосфорилирование — по убыли неорганического фосфата, который определялся по методу Лоури и Лопез в модификации Скулачева после 30 мин. экспозиции (¹³).

Таблица 1

Влияние гетероауксина на окислительное фосфорилирование в колеоптилях пшеницы разного возраста

Серии опытов	Вариант	Поглощение О, μ атомы	% к контролю	Поглощение Р, μ атомы	% к контролю	Р/О	% к контролю
42 часа							
А	К	$4,24 \pm 0,19$	—	$8,28 \pm 0,35$	—	$\frac{1,95}{1,69}$	—
		$2,20 \pm 0,22$		$3,90 \pm 0,29$			
	ИУК	$3,22 \pm 0,27$	75,9	$4,91 \pm 0,25$	59,2	$\frac{1,52}{1,24}$	76,9
		$1,93 \pm 0,23$	87,7	$2,41 \pm 0,11$	61,7		73,3
Б	К	$2,25 \pm 0,11$	—	$4,52 \pm 0,42$	—	$\frac{2,00}{1,38}$	—
		$2,76 \pm 0,09$		$3,81 \pm 0,11$			
	ИУК	$1,66 \pm 0,06$	73,7	$2,34 \pm 0,20$	51,7	$\frac{1,40}{1,23}$	70,0
		$2,68 \pm 0,14$	97,1	$3,32 \pm 0,16$	87,1		92,8
В	К	$5,04 \pm 0,26$	—	$9,11 \pm 0,19$	—	$\frac{1,80}{2,09}$	—
		$2,83 \pm 0,11$		$5,92 \pm 0,13$			
	ИУК	$5,25 \pm 0,26$	104,1	$7,64 \pm 0,16$	83,8	$\frac{1,45}{1,47}$	80,5
		$3,09 \pm 0,29$	109,1	$4,55 \pm 0,22$	76,8		70,3
72 часа							
А	К	$1,87 \pm 0,09$	—	$3,30 \pm 0,19$	—	$\frac{1,76}{1,37}$	—
		$1,68 \pm 0,08$		$2,32 \pm 0,16$			
	ИУК	$2,36 \pm 0,10$	126,2	$5,34 \pm 0,22$	161,8	$\frac{2,26}{1,95}$	128,4
		$2,02 \pm 0,11$	120,2	$3,95 \pm 0,23$	170,2		142,3
Б	К	$1,68 \pm 0,14$	—	$2,98 \pm 0,14$	—	$\frac{1,77}{1,67}$	—
		$2,08 \pm 0,12$		$3,48 \pm 0,08$			
	ИУК	$1,97 \pm 0,06$	117,2	$4,22 \pm 0,02$	144,9	$\frac{2,14}{2,31}$	120,9
		$1,93 \pm 0,08$	92,7	$4,46 \pm 0,04$	128,1		138,3
В	К	$1,78 \pm 0,12$	—	$3,17 \pm 0,15$	—	$\frac{1,78}{1,31}$	—
		$1,69 \pm 0,05$		$2,23 \pm 0,10$			
	ИУК	$2,83 \pm 0,19$	158,9	$6,95 \pm 0,27$	219,2	$\frac{2,45}{1,66}$	137,6
		$2,27 \pm 0,17$	134,3	$3,77 \pm 0,28$	169,0		126,7

Примечание. Серия А — выращивание на растворе ИУК, серия Б — выдерживание колеоптилей на растворе ИУК, 2 час.; серия В — внесение ИУК в сосудик Варбурга непосредственно к выделенным митохондриям. Над чертой — субстрат — кетоглутарат; под чертой — сукцинат.

Среда инкубации митохондрий в сосудике Варбурга (2 мл) содержала в μ мол: фосфата калия 30, KCl 50, $MgCl_2$ 10, глюкозы 50, АТФ 3, сахарозы 234, сукцинат К или α -кетоглутарата 40, 1 мг гексокиназы фирмы «Light» и 1 мл суспензии митохондрий (примерно 3—4 мг белка); $t = 25^\circ$, газовая среда — воздух. Расчет убыли Р и поглощения O_2 проводился в μ атомах на 1 мг белка митохондрий. Все определения проводились в двукратной повторности 8—10 раз.

Как видно из данных табл. 1, с возрастом окислительная и фосфорилирующая способность митохондрий падает. Так, поглощение кислорода митохондриями, выделенными из 72-часовых колеоптилей, составляет 76,31% от уровня дыхания 42-часовых при использовании сукцината. Фосфорилирующая активность с возрастом снижается в такой же степени. В результате этого отношение Р/О в 72-часовых колеоптилях остается на том же уровне, что и в 42-часовых. Наблюдаемое уменьшение окислительной и фосфорилирующей активности со старением клеток колеоптилей согласуется с результатами других исследований. Так, была отмечена сходная зависимость для разного возраста клеток корня кукурузы (¹⁴),

для мышц растущих крыс ⁽¹⁵⁾, для мышц цыплят разного возраста ⁽¹⁶⁾.

Далее исследовалось действие ИУК на процесс окислительного фосфорилирования митохондрий колеоптилей при выращивании растений пшеницы на растворе ауксина (серия А). Из табл. 1 видно, что в 72-часовых колеоптилях ИУК повышает фосфорилирующую (161,8%) и оксидативную (126,2%) активность митохондрий по сравнению с контролем при использовании α -кетоглутарата. Отношение Р/О составляет 128,4% против контроля. Такая же тенденция наблюдается при использовании в качестве субстрата сукцината. Для исключения влияния ИУК на зерновку проводились опыты, в которых колеоптиль, предварительно выращиваемые на воде, выдерживались на растворе ауксина в концентрации 5 мг/л в течение 2 час. (серия Б). Как видно из данных табл. 1, после выдерживания 72-часовых колеоптилей на растворе ИУК наблюдается усиление фосфорилирующей активности митохондрий, в результате чего отношение Р/О возрастает и составляет 120,9% для α -кетоглутарата и 138,3% для сукцината по сравнению с контролем.

Наконец, проводились опыты по непосредственному добавлению ИУК в реакционную среду к выделенным митохондриям (серия В), так что конечная концентрация ауксина в сосудике составляла 10^{-10} мол/л. Эта концентрация была подобрана опытным путем и оказывала максимальное влияние. Добавление ИУК к митохондриям клеток колеоптилей в фазу растяжения значительно повысило их дыхание на 58,9% и фосфорилирование на 119,2% по сравнению с контролем при использовании α -кетоглутарата и на 34,3% и 69,0% соответственно на сукцинате. Отношение Р/О возрастало на 37,6% на α -кетоглутарате и на 26,7% на сукцинате.

Митохондрии, выделенные из проростков пшеницы, выращенных на растворе ИУК (серия А) в фазу интенсивного деления клеток (42 часа), характеризуются пониженной по сравнению с контролем фосфорилирующей и окислительной способностью (табл. 1). Интенсивность дыхания митохондрий составляет 75,9%, фосфорилирование 59,2% по отношению к контролю при α -кетоглутарате. Отношение Р/О равно 1,52 против 1,95 при выращивании на воде. Такая же тенденция наблюдается и при использовании сукцината в качестве субстрата.

Выдерживание изолированных колеоптилей в течение 2 час. на растворе ИУК (серия Б) снижает окислительную способность митохондрий. Но особенно значительно снижается фосфорилирующая активность — до 2,34 мат. против 4,52 мат. на контроле при окислении α -кетоглутарата. Отношение Р/О также снижается и составляет 70% по сравнению с контролем.

При анализе этих данных возникает вопрос о способе действия ИУК на процесс окислительного фосфорилирования митохондрий. Действует ли как разобщитель непосредственно сама молекула ауксина или ИУК влияет на какие-то факторы в протоплазме, которые в свою очередь вызывают разобщающее действие? Для решения этого вопроса проводились опыты, где ИУК добавлялась в сосудик Варбурга *in vitro* до конечной концентрации 10^{-10} мол/л. В этом случае ИУК также значительно подавляла фосфорилирование и снижала отношение Р/О (серия В).

Касаясь причин столь различного влияния ИУК на процесс окислительного фосфорилирования митохондрий клеток разного возраста, можно высказать предположение, что способ действия экзогенной ИУК тесно связан с различным принципом регуляции в клетках разного возраста. Это в свою очередь, возможно, в какой-то мере зависит от уровня эндогенных стимуляторов и ингибиторов роста в клетках на разных фазах роста.

Нам было показано, что в фазу интенсивного деления клеток содержание ауксинов максимальное, далее с возрастом оно падает ⁽¹⁷⁾. Применение экзогенной ИУК в 42-часовых колеоптилях создает, видимо, повышенную концентрацию этого соединения в клетках, которая дейст-

вует как гербицидная. Есть данные, что гербицидная концентрация вещества типа ауксина — 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты или длительное выдерживание корней на растворе ИУК вызывает разобщающий эффект (¹⁸⁻²⁰). ИУК, примененная в фазу растяжения клеток, когда содержание эндогенных ауксинов резко снижается, оказывает типично спрыгающее действие.

Калининский государственный
педагогический институт им. М. И. Калинина

Поступило
26 XI 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Г. Кребс, Г. Корнберг, Превращение энергии в живых системах, ИЛ, 1959.
- ² В. С. Шапот, В сборн. Фосфорилирование и функция, Л., 1960.
- ³ М. Х. Чайлахян, В. Н. Ложникова, Физиол. раст., 9, 21 (1962).
- ⁴ В. И. Кефели, Р. Х. Турецкая, Л. П. Сарапуу, Физиол. раст., 2, 853 (1964).
- ⁵ J. Bonner, J. Am. Bot., 36, 323 (1949).
- ⁶ Н. И. Якушкина, Физиологическая природа действия ауксинов и передвижение органических веществ в растениях, Докторская диссертация, М., 1958.
- ⁷ W. Flaig, G. Schmidt, Landbauforschung Völkenrode, 12, 3 (1962).
- ⁸ Н. И. Якушкина, Т. В. Лихолат, ДАН, 161, 975 (1965).
- ⁹ E. Perkowski, Bull. Akad. polon. sci., ser. biol., 8, 45 (1960).
- ¹⁰ W. W. Nowinski, W. S. Mahoffey, Nature, 183, 45 (1959).
- ¹¹ Н. М. Сисакян, В. Я. Калачева, Биохимия, 26, 877 (1961).
- ¹² В. В. Умбрейт, Р. * Буррис, Дж. Ф. Штауффер, Манометрические методы изучения тканевого обмена, ИЛ, 1951.
- ¹³ В. П. Скулачев, Л. Л. Киселев, Биохимия, 25, 10 (1960).
- ¹⁴ H. A. Lund, A. E. Katter, J. B. Hanson, Biophys. and Biochem. Cytol., 4, 1 (1958).
- ¹⁵ C. Martius, Proc. III Intern. Congr. Biochem., 1955, Brussels, N. Y., 1956, p. 1.
- ¹⁶ С. Е. Северин, В. П. Скулачев и др., ДАН, 134, 1468 (1960).
- ¹⁷ Т. В. Лихолат, Л. П. Груздева и др., ДАН, 199, 231 (1971).
- ¹⁸ R. T. Wedding, M. K. Black, Plant Physiol., 38, 157 (1963).
- ¹⁹ J. L. Kay, J. B. Hanson, R. F. Bills, Plant Physiol., 35, 177 (1960).
- ²⁰ Л. В. Можалева, А. А. Никитина, Изв. ТСХА, 6, 8 (1969).