

Член-корреспондент АН СССР А. А. ШЛЫК, И. В. ПРУДИНKOVA,
Л. К. КАМЫШЕНКО, Т. В. ЛОСИЦКАЯ, З. И. МИЦУК, М. С. ГРОЗОВСКАЯ

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ СИНТЕЗА РНК НА ОБРАЗОВАНИЕ ХЛОРОФИЛЛОВ *a* И *b* В ПОСТЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКАХ

Применение ингибиторов синтеза РНК и безка обнаружилось связь образования хлорофиллов с работой белоксинтезирующей системы хлоропластов. Показано, что актиномицин D подавляет накопление хлорофилла в постэтиолированных проростках при введении его до или в течение лаг-фазы и в период интенсивного зеленения (¹⁻⁵). Замена природных пуринов и пиримидинов их структурными аналогами, вызывающими образование видоизмененных РНК, в частности 8-азагуанином и 5-галоидурацилами, также приводит обычно к угнетению синтеза хлорофилла в процессе зеленения (^{3, 6-8}), но в ряде работ этого не наблюдалось (^{4, 9}).

В начале зеленения особенно велико преобладание хлорофилла *a*, отложение которого к содержанию хлорофилла *b* падает от бесконечно большого в нулевой момент ко все более близкому в течение первых секунд и минут освещения, но еще десятки минут столь велико, что обычно затрудняет определение хлорофилла *b*. Потребовались специальные приемы, чтобы обнаружить присутствие хлорофилла *b* в ранний период (^{10, 11}). Поэтому до сих пор изучалось влияние ингибиторов только на накопление хлорофилла *a*, но не на образование хлорофилла *b*. Доказательство последовательного биосинтеза хлорофилла *b* избирательно из свежееобразованных молекул хлорофилла *a* (¹²) позволило использовать ингибиторы синтеза РНК для выяснения организации биосинтеза обоих хлорофиллов. Это сделано в настоящей работе в двух вариантах опытов — в процессе зеленения этиолированных листьев на свету и при повторном их затемнении после возникновения первых молекул хлорофилла *a*.

8-дневные проростки ячменя и ржи выращивали в темноте при $25 \pm 2^\circ$. Листья длиной 8–9 см срезали при безопасном зеленом свете, взвешивали и укладывали между двумя слоями фильтровальной бумаги. Безопасность примененного зеленого света проверили в четырех специальных опытах: содержание протохлорофиллида в этиолированных проростках, не подвергавшихся освещению, составлявшее $8,5 \pm 0,7$ нмол. на 1 г сырого веса, полностью сохранялось после 2,5 час. зеленого света, когда оно было равно $8,6 \pm 0,5$ нмол/г. Бумагу увлажняли раствором ингибитора в 0,2 *M* сахарозе или 0,2 *M* сахарозой без ингибитора (контрольный вариант, далее называемый водным). Все пробы выдерживали 20 час. в темноте при 25° . Для исследования накопления хлорофиллов *a* и *b* при зеленении листья ячменя после такой темновой инкубации освещали 6, 12 и 24 часа люминесцентными лампами ЛБ-40 (2000 лк). Темновое накопление хлорофилла *b* исследовали на листьях ржи, которые после 20-часовой темновой инкубации в присутствии ингибитора освещали 1 мин. (2000 лк), а затем возвращали в темноту на 24 часа. Во всех случаях пробы фиксировали 2 мин. паром. Содержание хлорофилла *a* (в сумме с хлорофиллидом) определяли по (¹³), а соотношение хлорофиллов *b* и *a* — по спектрам флуоресценции (¹⁴).

Актиномицин D и 8-азагуанин в значительной степени и статистически надежно (по критерию Стьюдента) ингибируют биосинтез хлорофилла *a* (рис. 1А). Выраженная в процентах от водного варианта разность между ним и содержанием пигмента в актиномициновом варианте (процент ингибирования) составляет после 6 час. зеленения $66,4 \pm 2,8$, после 12 час.

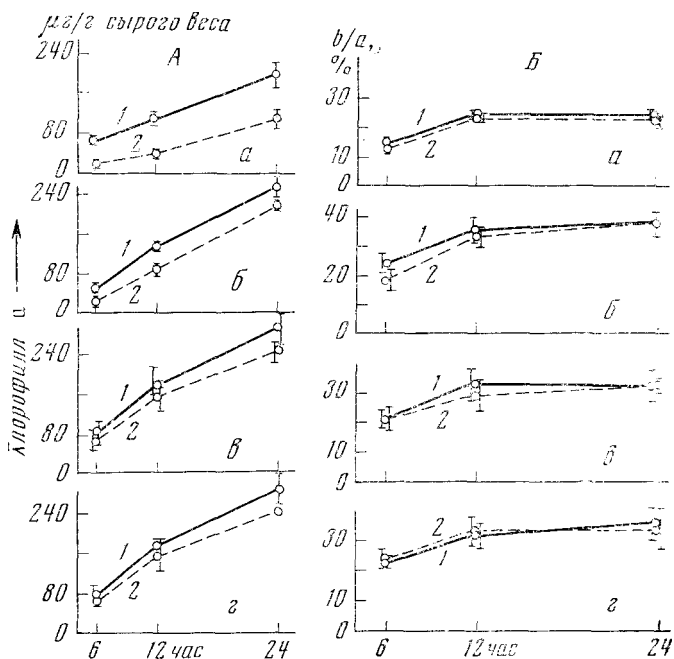


Рис. 1. Изменение содержания хлорофилла а (А) и отношения хл. b/хл. а (Б) в процессе зеленения этиолированных проростков ячменя в водном (1) и ингибиторных (2) вариантах. а — актиномицин D, б — 8-азагуанин, в — 5-фторурацил, г — 5-бромурацил

$62,2 \pm 4,2$, после 24 час. $49,9 \pm 12,4\%$. Аналогичные величины в опытах с 8-азагуанином равны $53,0 \pm 4,2$; $35,0 \pm 12,5$; $15,0 \pm 4,5\%$. Таким образом, относительная степень ингибирования со временем уменьшается. Галондурацилы подавляют хлорофиллообразование слабее, но тем не менее уменьшение синтеза хлорофилла а отмечалось во всех опытах; максимальное ингибирование 5-фторурацилом было 35%, а 5-бромурацилом 25%.

Процент ингибирования синтеза хлорофилла b всеми примененными ингибиторами равен или очень близок проценту угнетения синтеза хлорофилла а. Как результат этого, отношение количеств хл. b/хл. а (рис. 1Б) практически одинаково в водном и ингибиторных вариантах. О тесной корреляции ингибирования накопления обоих хлорофиллов свидетельствует и рис. 2, где точки, отражающие накопление хлорофилла b в зависимости от накопления хлорофилла а при обработке ингибиторами, легли на кривую, характеризующую взаимосвязь хлорофиллов b и а в водном варианте. Это означает, что ингибиторы синтеза РНК не оказывают прямого действия на превращение хлорофилла а в хлорофилл b, а влияют опосредованно через угнетение синтеза хлорофилла а.

К такому же заключению привело и изучение влияния ингибиторов синтеза РНК на темновое образование хлорофилла b в постэтиолированных проростках ржи. В этом случае наличие всего 1 мин. освещения, естественно, привело к близости во всех вариантах содержания хлорофилла а, возникающего из заранее сформировавшегося в этиолированных листьях протохлорофиллида. Пока неясно, насколько устойчиво влияние на него азагуанина (табл. 1). Что же касается накопления хлорофилла b, то в этих условиях оно как бы отделяется от образования хлорофилла а, ибо за 1 мин. успевает произойти лишь в очень малой степени (^{10, 11}) и практически нацело осуществляется во время повторного затемнения, достигая 20% от содержания хлорофилла а. Как следует из табл. 1, это соот-

ношение количеств хлорофиллов b и a в водном и каждом ингибиторном варианте после затемнения постэтиолированных проростков практически одинаково. Его неизменность и в этом случае можно с особым основанием рассматривать как отражение нечувствительности реакции превращения хлорофилла a в хлорофилл b к угнетению синтеза РНК.

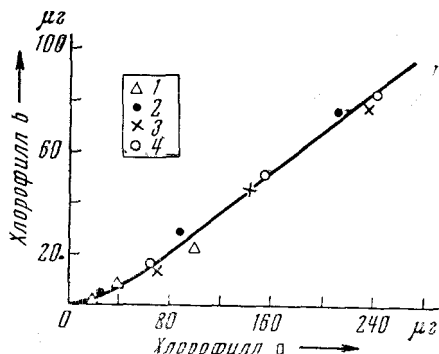


Рис. 2. Связь содержания хлорофилла b с содержанием хлорофилла a в процессе зеленения этиолированных проростков ячменя. 1 — актиномицин D, 2 — 8-азагуанин, 3 — 5-фторурацил, 4 — 5-бромурацил

b⁽¹⁷⁾, что было интерпретировано как результат действия фитохрома (через белковый синтез) на общий объем системы центров биосинтеза хлорофилла без столь же существенного влияния на события, локализованные внутри единичных центров, каковым и является реакция превращения хлорофилла a в хлорофилл b. При исследовании темнового накопления протохлорофиллида зелеными листьями в присутствии хлорамфеникола или кинетина^(15, 16) был сделан аналогичный вывод о том, что ингибирование или стимулирование белкового синтеза приводит к уменьшению или увеличению числа работающих центров биосинтеза, а события внутри центра менее чувствительны к этим воздействиям. В последнем случае событиями, по которым судили о состоянии единичных центров биосинтеза, были такие, которые проявляются в степени активности возникающего в них протохлорофиллида и в отношении скорости биосинтеза протохлорофиллида к пределу, до которого продолжается его накопление при затемнении. Оба эти показателя в первом приближении оказались неизменными. Полученные нами сейчас результаты позволяют распространить сделанный вывод и на биосинтез хлорофилла в постэтиолированных листьях и показывают, что ингибиторы синтеза РНК уменьшают общую активность системы центров, подавляя накопление хлорофиллов, связанное с развитием новых структурных элементов пластиды, но не влияют на реакцию превращения хлорофилла a в хлорофилл b как стадию пигментного метаболизма, осуществляемую внутри единичного центра.

Таблица 1

Относительное содержание хлорофилла a, хлорофилла b и их соотношение после затемнения постэтиолированных проростков ржи, обработанных ингибиторами синтеза РНК *

Вариант и концентрация	Хлорофилл a, %	Хлорофилл b, %	b/a
Вода	100	100	100
Актиномицин D			
4·10 ⁻⁵ M	100±1	100±2	100±1
8-азагуанин			
5·10 ⁻³ M	84±9	82±17	97±13
5-фторурацил	107±3	110±6	105±8
5-бромурацил			
5·10 ⁻³ M	106±5	101±7	96±3

* За 100 приняты соответствующие величины водного варианта (все расчеты производили на единицу сырого веса ткани).

По-видимому, и в процессе зеленения, когда синтез новых белков требуется для превращения этиопласта в хлоропласт, и в уже зеленых листьях с вполне сформированными хлоропластами, где синтез белков необходим для обновления уже существующих фондов, этот синтез определяет прежде всего входные реакции центров биосинтеза хлорофилла, объем которых регистрируется по накоплению протохлорофиллида в темноте или хлорофилла а на свету и зависит от общего числа проявляющих активность центров. В полной мере это относится и к общему количеству хлорофилла b, образуемого этой системой центров, если это количество измерять в расчете на лист или хлоропласт, единицу их площади или массы. Чем больше имеется активных центров биосинтеза хлорофилла, тем больше накапливается каждого из продуктов их деятельности, ибо эти продукты находятся в как бы пропорциональных друг другу отношениях. Эти-то пропорции и видны, когда оценивают долю протохлорофиллида, находящегося в активном состоянии, или сопоставляют отношение скорости образования протохлорофиллида к предельному уровню его накопления, зависящему от емкости системы, или регистрируют количество хлорофилла b по отношению к количеству хлорофилла а, т. е. в расчете на единицу последнего, служащего как бы мерой объема системы центров биосинтеза.

Лишь определенная доля молекул хлорофилла а, находящихся в лабильном состоянии, превращается в хлорофилл b. Именно поэтому на рис. 2 получается единая кривая соотношения количеств этих пигментов независимо от того, определено ли содержание хлорофилла а просто временем зеленения или его замедлением при действии ингибиторов. Не время, как полагали некоторые авторы (¹⁸), а количество лабильной формы хлорофилла а определяет степень его превращения в хлорофилл b. Остальной хлорофилл а уже не может изменить эту величину. При нормальном белковом синтезе число активных центров биосинтеза хлорофилла и количество развивающихся элементов структуры хлоропласта больше, чем при его ингибировании, поэтому накапливается больше и каждого пигмента. Однако ограничение числа активных центров в результате нарушения белкового синтеза, сопровождаемое уменьшением общего количества всех пигментов, не отражается непосредственным образом на работоспособности каждого центра, остающегося активным, и доля молекул хлорофилла а, превращаемых в хлорофилл b, поэтому оказывается неизменной. Каждая имеющаяся единица полиферментного комплекса хлорофилл-синтетазы в центре биосинтеза хлорофилла работает, таким образом, в первом приближении независимо от общей интенсивности белкового синтеза, ибо создана им как единое целое, и поэтому ингибирование и стимулирование белкового синтеза меняют число таких единиц с сохранением постоянного соотношения между всеми продуктами их деятельности. На этот основной фон накладываются менее существенные изменения и внутри центров.

Лаборатория биофизики и изотопов

Академии наук БССР

Минск

Поступило

1 VIII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. Aoki, E. Hase, *Plant and Cell Physiol.*, 5, 485 (1964). ² D. R. McCalla, R. K. Allen, *Nature*, 201, 504 (1964). ³ T. G. Beridze, M. S. Odintsova et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23, 683 (1966). ⁴ M. Gassman, L. Bogorad, *Plant Physiol.*, 42, 774 (1967). ⁵ B. A. Melandri, A. Baccarini, G. Forti, *Plant Physiol.*, 44, 95 (1969). ⁶ R. M. Smillie, *Canad. J. Bot.*, 41, 123 (1963). ⁷ W. R. Evans, R. M. Smillie, *J. Exp. Bot.*, 22, 371 (1971). ⁸ S. Aoki, J. K. Matsubara, E. Hase, *Plant and Cell Physiol.*, 6, 475 (1965). ⁹ K. Nadler, S. Granick, *Plant Physiol.*, 46, 240 (1970). ¹⁰ А. Б. Рудой, А. А. Шлык, А. Ю. Везицкий, *ДАН*, 183, 215 (1968). ¹¹ А. А. Шлык, А. В. Рудой, А. Ю. Везицкий, *Photosynthetica*, 4, 68 (1970). ¹² А. А. Шлык, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 22, 169 (1971). ¹³ L. G. Holm, *Acta agricult. scand.*, 4, 457 (1954). ¹⁴ А. Б. Рудой, А. Ю. Везицкий, А. А. Шлык, *ДАН*, 201, 230 (1971). ¹⁵ А. А. Шлык, Г. Е. Савченко и др., *ДАН*, 188, 718 (1969). ¹⁶ А. А. Шлык, Г. Вальтер и др., *ДАН*, 193, 1429 (1970). ¹⁷ А. А. Шлык, Г. Е. Савченко и др., *ДАН*, 171, 1443 (1966). ¹⁸ J. H. C. Smith, V. M. K. Young, In: *Radiation Biology*, 3, 1956, p. 393.