

УДК 581(132+174)+541.144.7

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

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

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ СИНТЕЗА РНК НА БИОСИНТЕЗ ПРОТОХЛОРОФИЛЛИДА В ПОСТЭТИОЛИРОВАННЫХ И ЗЕЛЕННЫХ ПРОРОСТКАХ ЯЧМЕНЯ

Применение ингибиторов синтеза РНК и белка сыграло значительную роль в исследовании взаимосвязи биосинтеза хлорофилла и белка (¹⁻³). Однако этот вопрос все еще остается во многом неясным, и причину можно видеть как в сложности генетического управления жизнедеятельностью хлоропластов, так и в том, что экспериментальные данные получены в основном на постэтиолированных объектах, когда накопление хлорофилла происходит вместе с развитием ламеллярно-гранулярной структуры и трудно расчлениить эти две стороны единого процесса превращения этиопласта в хлоропласт. Поэтому особый интерес приобретает работа с зелеными листьями, содержащими сформированные хлоропласты, хлорофилл которых подвергается обновлению в течение всей их жизни. К настоящему времени разработаны методы, позволяющие судить о биосинтезе хлорофилла в таких листьях либо по включению изотопов, либо по накоплению протохлорофиллида (П) при блокировании его превращения переносом в темноту (⁶). Ранее в нашей лаборатории установлена зависимость темнового накопления П в зеленых листьях от ингибирования белкового синтеза в хлоропластах хлорамфениколом (⁷) и его стимулирования кинетином (^{8, 9}). Изотопным методом показана связь обновления хлорофилла с синтезом белков и РНК (¹⁰). Настоящее исследование посвящено сравнительному изучению влияния ингибиторов синтеза РНК на биосинтез П и его способность к фотовосстановлению в постэтиолированных и зеленых проростках.

7—8-дневные проростки ячменя, выращенные под люминесцентными лампами ЛБ-40 (5000—7000 лк), и этиолированные растения того же возраста срезали над колеоптилем, взвешивали, раскладывали между слоями фильтровальной бумаги, увлажненной 0,2 М раствором сахарозы с добавлением или без добавления ингибитора, и переносили в темноту. Первые анализы проводили после 20 час. инкубации проб в темноте (Т₀). Затем листья освещали (этиолированные 1 мин., зеленые 30 мин.) лампами ЛБ-40 при $25 \pm 2^\circ$ и 2000 лк (С₁), вновь затемняли (этиолированные на 3 часа, зеленые на 24 часа) (Т) и повторно освещали (этиолированные 1 мин. при 25° , зеленые 30 мин. при 0°) теми же лампами (С₂). Пробы фиксировали 2 мин. паром. Содержание хлорофилла а в зеленых листьях находили по спектру поглощения экстракта в 100% ацетоне по (¹¹), после чего пигменты переводили в этиловый эфир для спектрофлуорографического определения количества П по (¹²). Зеленые листья не содержат эстерифицированного П (⁶), данные же о содержании П в постэтиолированных листьях, полученные по спектрам поглощения в 80% ацетоне по (¹³), включают и протохлорофилл (их разделяли только в контрольных опытах). Было проверено, что 20-часовая темновая инкубация срезанных этиолированных листьев на 0,2 М сахарозе не приводит к изменению содержания П. В нормально растущих 7-дневных листьях оно составляло $8,5 \pm 0,7$, а в срезанных и выдержанных 20 час. — $8,5 \pm 0,2$ нмоля на 1 г свежего веса. Неизменным оставался и уровень неактивного П, $3,5 \pm 0,1$

Таблица 1

Влияние ингибиторов на содержание протохлорофиллида в листьях ячменя

Ингибитор	T_0	C_1	T	C_2
В этиолированных листьях, нмоль на 1 г свежего веса				
Без ингибитора	$8,5 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,1$	$6,0 \pm 0,8$	$2,1 \pm 0,1$
Актиномицин D ($4 \cdot 10^{-5} M$)	$8,2 \pm 0,5$	$3,2 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,7$
Без ингибитора	$4,7 \pm 0,9$	$2,0 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,1$
8-азагуанин ($5 \cdot 10^{-3} M$)	$4,9 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,2$
Без ингибитора	$10,8 \pm 0,7$	$3,6 \pm 0,1$	$7,5 \pm 0,4$	$2,4 \pm 0,1$
5-фторурацил ($5 \cdot 10^{-3} M$)	$10,3 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,1$	$5,5 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,2$
В зеленых листьях ммоль/моль хлорофилла а				
Без ингибитора	$8,7 \pm 0,7$	$3,7 \pm 0,2$	$6,5 \pm 0,6$	$4,2 \pm 0,2$
Актиномицин D ($4 \cdot 10^{-5} M$)	$8,8 \pm 0,9$	$3,8 \pm 0,2$	$4,7 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,2$
Без ингибитора	$7,3 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,7$	$5,8 \pm 1,5$	$2,4 \pm 0,5$
8-азагуанин ($5 \cdot 10^{-3} M$)	$6,9 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,6$	$3,7 \pm 1,1$	$2,2 \pm 0,5$
Без ингибитора	$7,3 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,3$	$6,3 \pm 0,5$	$2,6 \pm 0,1$
5-фторурацил ($1 \cdot 10^{-2} M$)	$7,9 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,3$	$5,3 \pm 0,4$	$2,9 \pm 0,2$

Таблица 2

Влияние ингибиторов на темновую прибыль содержания протохлорофиллида и его фотопревращение при повторном освещении

Ингибитор	$(T - C_1)_{\text{инг}} / (T - C_1)_{\text{вода}}$	$(T - C_2)_{\text{инг}} / (T - C_2)_{\text{вода}}$	$\frac{(T - C_2)_{\text{инг}}}{(T - C_1)_{\text{инг}}} : \frac{(T - C_2)_{\text{вода}}}{(T - C_1)_{\text{вода}}}$
В постэтиолированных листьях			
Актиномицин D	$0,23 \pm 0,05$	$0,20 \pm 0,07$	$0,60 \pm 0,29$
8-азагуанин	$0,47 \pm 0,12$	$0,63 \pm 0,10$	$0,97 \pm 0,22$
5-фторурацил	$0,43 \pm 0,05$	$0,52 \pm 0,07$	$1,25 \pm 0,16$
В зеленых листьях			
Актиномицин D	$0,35 \pm 0,08$	$0,31 \pm 0,08$	$0,94 \pm 0,10$
8-азагуанин	$0,39 \pm 0,06$	$0,44 \pm 0,05$	$0,89 \pm 0,03$
5-фторурацил	$0,71 \pm 0,05$	$0,68 \pm 0,16$	$0,98 \pm 0,23$

и $3,2 \pm 0,1$ нмоля на 1 г свежего веса соответственно. Отсутствие сахарозы приводило к разрушению П на 10%. В пробах из зеленых проростков содержание хлорофилла а после повторного затемнения (Т) было на несколько (до 10) процентов ниже, чем в вариантах T_0 и C_1 . Это снижение не зависело от присутствия ингибитора и, по-видимому, не могло существенно повлиять на определение содержания П.

Как видно из табл. 1, 20-часовая темновая инкубация на растворах ингибиторов синтеза РНК не сказывается на содержании П в вариантах T_0 и C_1 . Это означает, что ингибиторы не влияют на содержание и способность к фотопревращению того П, который уже имелся в листе или накапливался вскоре после введения ингибитора, действие которого проявляется, следовательно, лишь через определенное время. На накопление же П при повторном затемнении все ингибиторы, несомненно, влияют. Разность $T - C_1$ в присутствии актиномицина составила только 23—35% на наблюдаемой без него (табл. 2), и степень ингибирования оказалась равной 77—65% как в постэтиолированных, так и в зеленых листьях. Сходной в обоих случаях была и степень ингибирования ресинтеза П азагуанином. Только фторурацил слабее действовал на зеленые листья, где для получения статистически надежного эффекта его концентрацию подняли вдвое

по сравнению с применяемой для постэтиолированных, но степень ингибирования все же не превысила 30% по сравнению с 57% в опытах с постэтиолированными растениями. Учитывая, что во время повторного затемнения постэтиолированных листьев убывает содержащийся в них протохлорофилл (¹⁴), в опытах с фторурацилом его и П разделили по (¹⁵) и убедились, что этой убылью не объясняется уменьшение темнового накопления суммы пигментов под действием ингибитора.

В целом проведенные исследования обнаружили принципиально сходное, а в случае двух ингибиторов — даже количественно одинаковое действие ингибиторов синтеза РНК на накопление П в постэтиолированных проростках с несложившейся структурой и в зеленых растениях, содержащих зре-

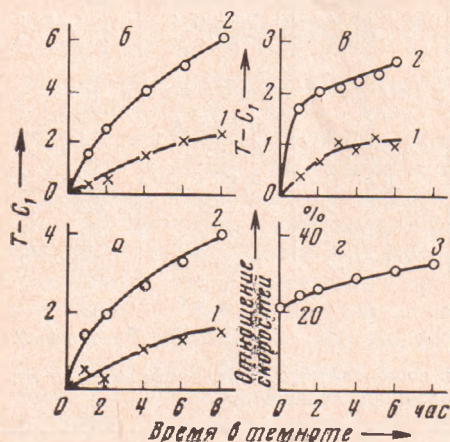


Рис. 1. Начальные участки кривых темнового накопления протохлорофиллида (а, б, в) и соотношение скоростей этого процесса в разные моменты времени (г) в присутствии актиномицина и без него. Скорости оценивали по величине тангенса угла наклона касательной к соответствующему участку кривой. 1 — водный контроль, 2 — актиномициновый вариант, 3 — отношение скоростей ресинтеза П актиномицинового варианта к водному

лые, полностью сформированные хлоропласты. Это означает, что РНК, необходимые для биосинтеза хлорофилла, так же как и белки (⁷), нуждаются в обновлении и не могут постоянно обеспечивать нормальный процесс образования пигментов в зеленом листе без восполнения новым синтезом.

Средняя часть табл. 2 показывает, что меньшему количеству П, накопившемуся в темноте в присутствии ингибитора, соответствует и меньшая его убыль при повторном освещении. Содержание П в зеленых листьях в варианте С₂ практически равно имевшемуся в варианте С₁ (табл. 1) и указывает на сохранение в ткани прежнего количества неактивного пигмента. В постэтиолированных листьях С₂ обычно меньше, чем С₁, что отражает переход части неактивного П в активное состояние (¹⁵). Только в случае актиномицина можно говорить о влиянии ингибитора на эту активацию, чему соответствует и уменьшение доли П, способного к фотопревращению (табл. 2, правая часть). Однако разброс данных мешает установить надежность такого действия актиномицина. В целом же все ингибиторы синтеза РНК, подавляя темновое накопление П, не препятствовали появлению его определенной доли в активном состоянии, требующем размещения на соответствующем белковом носителе и контакта с донором водорода. Эти результаты созвучны полученным в опытах с кинетином, в которых стимулирование темнового накопления П происходило без изменения соотношения способной и неспособной к фотовосстановлению форм пигмента (⁹, ¹⁵).

Из табл. 2 следует, что предельное накопление П при затемнении зеленых листьев в присутствии актиномицина составляет 35% от наблюдаемого в водном варианте. На рис. 1 приведены результаты 3 опытов по изучению влияния ингибитора на начальные участки кривых накопления. Видно, что при ингибировании синтеза РНК процесс ресинтеза П нарушается на всем его протяжении, так что сниженными оказываются и начальная скорость, и предельный уровень. Можно полагать, что оба эти показателя являются сопряженными характеристиками центров биосинтеза хлорофилла (¹⁶) — элементарных структурных единиц, в пределах которых происхо-

дит и образование, и накопление П. Число таких единиц оказывается той переменной, на которой ингибирование синтеза РНК и белка отражается главным образом. Этому соответствует и отсутствие действия ингибиторов на соотношение активной и неактивной в фотопревращении форм П при затемнении зеленых листьев (табл. 2). Ранее к такому же заключению привел и тот факт, что дезактивация фитохрома (¹⁷) вызывает уменьшение биосинтеза П, но не влияет на превращение хлорофилла а в хлорофилл b. Ингибиторы синтеза РНК, уменьшая накопление обоих хлорофиллов (¹⁸) и включение изотопной метки в эти пигменты (¹⁰), также не влияют на скорость образования хлорофилла b из хлорофилла а. Количество накапливаемого П, по-видимому, дает прежде всего представление об общем объеме активных центров биосинтеза хлорофилла в изучаемой системе, тогда как степень активности П или превращение хлорофилла а в хлорофилл b определяются внутренними характеристиками единичных центров. Этими внутренними характеристиками определяется прежде всего и форма кинетической кривой накопления П.

Такое заключение соответствует также характеру действия на ресинтез П хлорамфеникола (⁷) и кинетина (^{8, 9, 15}). Вместе с тем, более подробное изучение (¹⁹) показало, что биосинтез хлорофилла сопряжен с синтезом белка в нескольких (не менее трех) пунктах, чувствительность системы в которых не одинакова. В частности, введение δ-аминолевулиновой кислоты частично, но не полностью снимает действие хлорамфеникола на ресинтез П (¹⁹). Данные рис. 1 также показывают, что действие актиномицина на начальную скорость несколько сильнее, чем на предельный уровень: в присутствии антибиотика начальная скорость составила в среднем только 21% от наблюдавшейся в водном контроле. По мере накопления пигмента эта величина постепенно повышалась в пределе до 35%. Следовательно, вызываемое ингибированием синтеза РНК уменьшение объема системы активных центров биосинтеза хлорофилла дополнительно сопровождается также ослаблением ферментативной активности и работающих центров. Можно полагать, что это связано с особой чувствительностью синтетазы δ-аминолевулиновой кислоты. Последней может объясняться и то, что вызываемое кинетином повышение начальной скорости и предельного уровня накопления П особенно сильно отражается именно на начальной скорости (²⁰).

Институт фотобиологии
Академии наук БССР
Минск

Поступило
12 IV 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. T. O. Kirk, R. A. E. Tilney-Bassett, *The Plastids*, 1967. ² T. G. Beridze, M. S. Odintsova et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23**, 683 (1966).
- ³ M. Gassman L. Bogorad, *Plant Physiol.*, **42**, 744, 781 (1967). ⁴ R. M. Smillie, N. S. Scott, In: *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, **1**, 1969, p. 136.
- ⁵ K. Nadler, S. Granik, *Plant Physiol.*, **46**, 240 (1970). ⁶ А. А. Шлык, *Метаболизм хлорофилла в зеленом растении*, Минск, 1965.
- ⁷ А. А. Шлык, Г. Е. Савченко и др. *ДАН*, **188**, 718 (1969). ⁸ А. А. Шлык, Н. Г. Аверина, *ДАН*, **186**, 1209 (1969).
- ⁹ А. А. Шлык, Г. Вальтер и др., *ДАН*, **193**, 1429 (1970). ¹⁰ А. А. Шлык, В. И. Гапоненко и др., *ДАН*, **207**, 1002 (1972).
- ¹¹ L. G. Holm, *Acta agricult. Scand.*, **4**, 457 (1954). ¹² А. А. Шлык, Г. Е. Савченко, Н. Г. Аверина, *Биофизика*, **14**, 119 (1969).
- ¹³ J. M. Anderson, N. K. Boardman, *Austr. J. Biol.*, **17**, 93 (1964). ¹⁴ А. Б. Рудой, А. Ю. Везицкий, А. А. Шлык, *ДАН*, **201**, 230 (1971).
- ¹⁵ Н. Г. Аверина, А. А. Шлык, *Физиол. раст.*, **19**, 487 (1972). ¹⁶ А. А. Shlyk, I. V. Prudnikova et al., In: *Progress in Photosynthesis Research*, **2**, 572 (1969).
- ¹⁷ А. А. Шлык, Г. Е. Савченко и др., *ДАН*, **171**, 1443 (1966). ¹⁸ А. А. Шлык, И. В. Прудникова и др., *ДАН*, **208**, 472 (1973).
- ¹⁹ А. А. Шлык, Н. Н. Костюк, *ДАН*, **206**, 1002 (1972). ²⁰ А. А. Шлык, Н. Г. Аверина, *ДАН* (в печати).