

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 ЗЕЛЕНЫХ 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 расчленить 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 накоплениюprotoхлорофиллида (П) при блокировании его превращения переносом в темпцию (⁴). Ранее в нашей лаборатории установлена зависимость темнового накопления П в зеленых листьях от ингибирования белкового синтеза в хлоропластах хлорамфениколом (⁵) и его стимулирования кинетином (^{6, 7}). Изотопным методом показана связь обновления хлорофилла с синтезом белков и РНК (¹⁰). Настоящее исследование посвящено сравнительно-му 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 M раствором сахарозы с добавлением или без добавления ингибитора, и переносили в темноту. Первые анализы проводили после 20 чес. инкубации проб в темноте (T_0). Затем листья освещали (этиолированные 1 мин., зеленые 30 мин.) лампами ЛБ-40 при $25 \pm 2^\circ$ и 2000 лк (C_1), вновь затемняли (этиолированные на 3 часа, зеленые на 24 часа) (T) и повторно освещали (этиолированные 1 мин. при 25° , зеленые 30 мин. при 0°) теми же лампами (C_2). 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 protoхлорофилл (их разделяли только в контрольных опытах). Было проверено, что 20-часовая темновая инкубация срезанных этиолированных листьев на 0,2 M 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 содержаниеprotoхлорофилла в листьях ячменя

Ингибитор	T_0	C_1	T	C_2
В этиолированных листьях, нмоль на 1 г свежего веса				
Без ингибитора	$8,5 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,1$	$6,0 \pm 0,8$	$2,4 \pm 0,1$
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 ммол / моль хлорофилла				
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 содержанияprotoхлорофилла и его фотопревращение при повторном освещении

Ингибитор	$(T - C_1)_{\text{инг}} / (T - C_1)_{\text{вода}}$	$(T - C_2)_{\text{инг}} / (T - C_2)_{\text{вода}}$	$\left(\frac{T - C_2}{T - C_1} \right)_{\text{инг}} : \left(\frac{T - C_2}{T - C_1} \right)_{\text{вода}}$
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	$0,35 \pm 0,08$	$0,31 \pm 0,08$	$0,94 \pm 0,40$
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 (T) 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 оказывается 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 постэтолированных, но степень ингибирования все же не превысила 30% по сравнению с 57% в опытах с постэтолированными растениями. Учитывая, что во время повторного затемнения постэтолированных листьев убывает содержавшийся 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 постэтолированных проростках с несложившейся структурой и в зеленых растениях, содержащих зре-

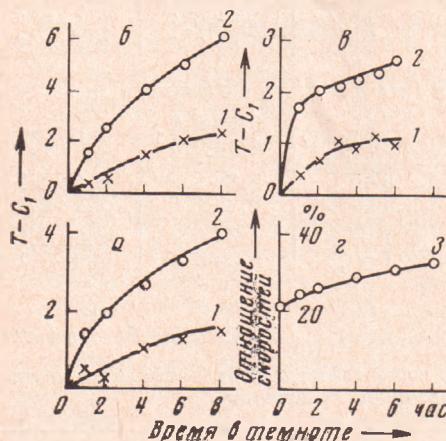


Рис. 1. Начальные участки кривых темнового накопленияprotoхлорофилла (a, b, c) и соотношения скоростей этого процесса в разные моменты времени (d) в присутствии актиномицина и без него. Скорости определяли по величине тангенса угла наклона касательной к соответствующему участку кривой. 1 — водный контроль, 2 — актиномицетовый вариант, 3 — отношение скоростей синтеза П актиномицетового варианта к водному

лье, полностью сформированные хлороплазты. 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 постэтолированных 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 кинетиком, в которых стимулирование темнового накопления П происходило без изменения соотношения способной и неспособной к фотовосстановлению форм пигmenta^(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 пакапливаемого 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 д-аминолевулиновой кислоты частично, но не полностью снижает 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 д-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. Veridze, 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. Granick, *Plant Physiol.*, **46**, 240 (1970). ⁶ А. А. Шлык, Метabolizm 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. Шлык, 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).