

УДК 581(132+174)+541.144.7

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Член-корреспондент АН СССР А. А. ШЛЫК, И. В. ПРУДНИКОВА,
Т. К. ПАРАМОНОВА

ОСОБЕННОСТИ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ХЛОРОФИЛЛОВОГО АППАРАТА ЗЕЛЕННЫХ ЛИСТЬЕВ, ВЫЗВАННЫЕ ХЛОРАМФЕНИКОЛОМ

Фракционирование дезинтегрированных хлоропластов обнаружило существование и преимущественную локализацию в определенных фрагментах хлоропласта особых элементов их структуры — центров биосинтеза хлорофилла (¹, ²). Сосредоточение центров во фракции, обогащаемой фотосистемой I, позволило предположить их особую связь с формированием новых единиц именно этой системы (¹⁻³). Наличие групповой локализации молекул протохлорофиллида и хлорофиллов (X) а и b в этиолированных листьях показало, что и процесс зеленения осуществляется подобными центрами (¹, ⁴, ⁵). Анализ влияния фитохрома, кинетина, ингибиторов синтеза РНК и белка на отдельные этапы цепи биосинтеза X привел к выводу, что, изменяя уровень белкового синтеза, можно регулировать число активных центров биосинтеза X как в этиолированных, так и в зеленых листьях, а также оказывать некоторое воздействие на отдельные внутренние характеристики центров (¹, ³, ⁶⁻⁸). Из этого следует предположение, что таким путем можно изменять количественные соотношения структурных элементов, соответствующих разным фотосистемам, а также их внутренние характеристики.

4-дневные зеленые проростки ячменя, выросшие в условиях водной культуры, переносили на раствор (0,1 г/л) хлорамфеникола (ХАФ), оставляя контрольную часть в прежних условиях. В ряде опытов на листовых пластинках отмечали положение верхушки coleoptily. Через 48 час. листья разрезали по отметке так, что нижняя часть листа представляла собой молодую ткань, выросшую в присутствии ХАФ, тогда как верхняя была сформирована до перенесения на раствор ингибитора. В водном варианте также разделяли соответствующие части листа. Пробы растирали в фосфатном буфере рН 8,0 с песком при 2–4°, пропускали через 2 слоя капрона и центрифугировали 2 мин. при 2000 g. Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость использовали в качестве исходного гомогената. К нему приливали раствор дезоксихолата натрия и KCl в этом же буфере до конечной концентрации детергента 0,4% и KCl 0,15 M, одновременно доводя содержание $X_a + X_b$ до 200 мкг/мл, и центрифугировали последовательно 30 мин. при 10 000 g, 30 мин. при 48 000 g и 60 мин. при 144 000 g. Осадки и надосадочную жидкость фиксировали 80% ацетоном и регистрировали их спектры поглощения на СФ-14. Количества X_a и X_b рассчитывали по (⁹).

ХАФ оказал отчетливое влияние на содержание X не только в молодой части листа, но и в заранее сформировавшейся. Хотя различия эффекта в отношении двух X в нашем случае не оказались статистически надежными, они соответствуют наблюдавшемуся в других исследованиях большему ингибированию накопления X_a , которое проявляется в снижении количественного соотношения $X_a:X_b$ (¹⁰). Это видно из следующего: содержание $X_a + X_b$ в процентах по отношению к пробам без ингибитора в целом листе для X_a составило $69,0 \pm 1,9$ и для X_b $73,6 \pm 3,8$, в нижней части листа для

Таблица 1

Относительное содержание суммы хлорофиллов а + b во фракциях

Фракция	Водный контроль	Вариант с ХАФ	ХАФ/Вода	Р	Вариант с ХАФ. % к водному контролю до фракционирования
	% к гомогенату				

Целый лист

Осадок, 10 000 g	58,8±3,0	67,0±3,5	1,13±0,06	0,04	46,8
48 000 g	19,8±2,1	16,8±2,0	0,86±0,06	0,04	11,9
144 000 g	8,4±0,6	4,7±0,2	0,62±0,05	≤0,001	3,3
Надосадочная жидкость, 144 000 g	3,6±0,5	4,9±0,6	1,33±0,17	0,08	3,4

Нижняя часть листа

Осадок, 10 000 g	66,5±3,7	74,0±5,5	1,12±0,08	0,23	38,0
48 000 g	18,3±0,9	5,6±2,1	0,30±0,11	≤0,001	2,9
144 000 g	10,6±1,3	5,1±0,7	0,46±0,09	≤0,001	2,6
Надосадочная жидкость, 144 000 g	5,6±0,7	8,5±0,7	1,26±0,16	0,21	4,4

Верхняя часть листа

Осадок, 10 000 g	63,7±5,2	71,5±3,1	1,16±0,13	0,30	56,6
48 000 g	18,2±2,6	13,4±5,4	0,78±0,13	0,17	10,2
144 000 g	8,0±2,1	3,3±0,4	0,52±0,08	≤0,001	2,6
Надосадочная жидкость, 144 000 g	3,8±0,4	4,7±0,2	1,28±0,12	0,09	3,7

Таблица 2

Отношение содержания хлорофиллов а : b во фракциях

Фракция	Водный контроль	Вариант с ХАФ	ХАФ/вода	Р
---------	-----------------	---------------	----------	---

Целый лист

Гомогенат	3,2±0,1	3,1±0,1	0,97±0,05	0,56
Осадок, 10 000 g	2,8±0,1	2,7±0,1	0,96±0,04	0,33
48 000 g	3,7±0,1	3,1±0,1	0,85±0,03	≤0,001
144 000 g	4,6±0,1	3,8±0,1	0,84±0,04	≤0,001
Надосадочная жидкость, 144 000 g	4,9±0,3	4,4±0,2	0,90±0,06	0,11

Нижняя часть листа

Гомогенат	2,7±0,2	2,1±0,2	0,80±0,07	0,06
Осадок, 10 000 g	2,6±0,2	2,2±0,2	0,84±0,05	0,05
48 000 g	3,3±0,2	2,2±0,2	0,65±0,04	≤0,001
144 000 g	3,9±0,2	2,7±0,2	0,69±0,04	≤0,001
Надосадочная жидкость, 144 000 g	3,4±0,4	2,7±0,2	0,82±0,09	0,13

Верхняя часть листа

Гомогенат	2,9±0,2	2,9±0,2	1,00±0,03	—
Осадок, 10 000 g	2,7±0,1	2,9±0,1	1,08±0,08	0,39
48 000 g	3,4±0,1	3,1±0,1	0,90±0,07	0,25
144 000 g	4,7±0,3	4,1±0,2	0,88±0,06	0,14
Надосадочная жидкость, 144 000 g	5,0±0,6	4,7±0,4	0,97±0,03	0,39

X_a 49,4±1,9 и для X_b 57,4±2,8, в верхней части листа 77,8±±4,2 и 81,4±5,2 соответственно. Влияние ХАФ на фракционирование суммы хлорофиллов X_a+X_b показано в табл. 1. Увеличение в варианте с ХАФ относительного содержания X_a+X_b в тяжелых частицах из целых листьев сопровождается меньшей долей мигментов в осадке 144 000 g и в

промежуточных частицах осадка 48 000 g. Фракционирование молодой ткани, выросшей уже в присутствии ХАФ, показало особенно отчетливое уменьшение содержания X в осадках 48 000 g и 144 000 g. Оно явно ощутимо и при фракционировании более старой ткани верхней части листа. В табл. 1 приведены также данные о содержании $X_a + X_b$ в каждой фракции варианта с ХАФ по отношению к сумме $X_a + X_b$ в целом листе (или его части) водного контроля; из них видно уменьшение абсолютного количества пигментов во всех фракциях, в том числе и в тяжелых частицах, где оно было менее сильным и потому доля пигментов в этой фракции оказалась повышенной.

Соотношение $X_a:X_b$, приведенное в табл. 2, показывает, что влияние ХАФ не затронуло или мало затронуло состав крупных частиц и отразилось в наибольшей степени на составе осадков 48 000 g и 144 000 g, особенно при фракционировании нижней части листа. Результаты, полученные для верхней части листа, повторяют общую картину с худшей статистикой, соответствующей меньшему влиянию ХАФ. Однако различия отношений $X_a:X_b$ между фракциями особенно велики при анализе именно этой части листа: фракции из нижней части листа с менее сформированной ламеллярной структурой пластид имели отношения $X_a:X_b$, более близкие друг к другу и меньшие по величине, чем фракции из верхней части листа с более зрелыми хлоропластами (см. также ⁽¹¹⁾).

На основании нашего материала представляется возможным сделать вывод, что снижение соотношения $X_a:X_b$ в листьях под влиянием ХАФ ⁽¹⁰⁾ обусловливается уменьшением в пигментном фонде доли материала, соответствующего легким фрагментам хлоропластов, а также избирательным уменьшением этого отношения именно в таких частицах. Классические работы Бордмана показали, что легкие фрагменты хлоропластов представляют собой главным образом частицы фотосистемы I. Предполагается, что они имеют избирательное происхождение из межгранных ламелл ⁽¹²⁾. Это становится особенно справедливым, когда в легкую фракцию отбирается небольшая часть материала ^(13, 14), как это было в наших опытах. Ведется оживленная дискуссия о том, в какой мере одиночные ламеллы содержат также фотосистему II. Многие авторы считают, что эта система развивается лишь (или преимущественно) при объединении одиночных ламелл с формированием гран. Хотя нерешенность этих и сопряженных вопросов затрудняет окончательное толкование описанных выше данных, их вероятная интерпретация представляется хорошо соответствующей концепции центров биосинтеза X и положению о формировании этими центрами прежде всего единиц фотосистемы I. Действительно, до опыта растения формировали обе фотосистемы в обычном соотношении. Далее частичное ингибирование синтеза тех белков, возникновение которых зависит от деятельности 70 S-рибосом хлоропластов и митохондрий, ограничивает образование новых единиц фотосинтетического аппарата. Возможно, что вначале оно еще протекает за счет предсуществовавших белковых структур под действием возникших ранее ферментов, к которым лишь в небольшой степени добавляются ферменты, продолжающие синтезироваться. Если центры биосинтеза связаны прежде всего с формированием системы I, то легко понять, что именно легкие фрагменты хлоропластов в первую очередь окажутся затронутыми действием ингибирования. При этом, как показали полученные данные, нарушение формирования элементов системы I приводит к уменьшению не только их абсолютного, но и относительного содержания. Пока трудно сказать, означает ли наблюдающееся меньшее влияние ингибитора на образование единиц фотосистемы II более медленное проявление его действия, например, в результате формирования этой системы на базе предсуществовавших единиц системы I (подобно формированию гран на базе одиночных ламелл). Уменьшение соотношения $X_a:X_b$ в легких частицах варианта с ХАФ допускает несколько интересных объяснений. Если полагать, что

эта фракция достаточно гомогенна, можно сделать вывод об изменении действительно пигментного состава частиц системы I, например, происходящих из межгранных ламелл. Однако не исключено и то, что в ней представлены также частицы системы I, происходящие из гран. В свете данных о меньшем соотношении количеств $X_a:X_b$ в частицах системы I гран, чем в частицах этой же системы I, но происходящих из межгранных ламелл (¹³), можно думать, что ингибирование белкового синтеза ведет к уменьшению доли материала, происходящего из межгранных ламелл. Имеются сообщения о том, что ХАФ вызывает изменения электронно-микроскопической структуры хлоропластов, проявляющиеся в нарушении развития межгранных ламелл и увеличении размера тилакоидов гран (¹⁰). Было бы весьма ценно сопоставить эти наблюдения с результатами количественного морфометрического анализа электронно-микроскопических структур. Наконец, снижение соотношения $X_a:X_b$, приближающее его к типичному для системы II, может быть результатом иного рода гетерогенности частиц осадка 144 000 g с включением в него, наряду с материалом системы I, также единиц системы II либо в виде примеси ее законченных элементов, либо в качестве еще формирующихся структур. Легко ожидать, что вызванное ингибитором уменьшение образования единицы системы I приведет именно к такому изменению соотношения $X_a:X_b$ в гетерогенном осадке, какое наблюдается по данным табл. 2. Добавим к этому, что хлоропласты из клеток *Euglena*, обработанных ХАФ, не обнаруживали активности фотосистемы I (¹⁵); отмечалось также, что ХАФ угнетал включение меченых аминокислот в ламеллярный белок, входящий в пигмент-белковый комплекс фотосистемы I (¹⁶). Дальнейшие исследования, развивая полученные в настоящей работе первые наблюдения о влиянии ингибирования белкового синтеза картину фракционирования пигментного материала, позволяет уточнить высказанные соображения, неизбежно носящие пока общий характер.

Институт фотобиологии
Академии наук БССР
Минск

Поступило
2 VII 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. A. Shlyk, I. V. Prudnikova et al., In: Progress in Photosynthesis Research, 2, Tübingen, 1969, p. 572. ² L. I. Vlasenok, A. A. Shlyk et al., VI Intern. Congress Photobiology, Bochum, 1972, p. 182. ³ A. A. Шлык, В сборн. Теоретические основы фотосинтетической продуктивности, М., 1972, стр. 34. ⁴ L. I. Fradkin, A. A. Shlyk et al., Photosynthetica, 3, 326 (1969); Proc. II Intern. Congress Photosynthesis Research, 1972, p. 2298. ⁵ A. A. Shlyk, A. B. Rudoi, A. Yu. Vesitskii, Photosynthetica, 4, 68 (1970); Proc. II Intern. Congress Photosynthesis Research, 1972, p. 2289. ⁶ A. A. Шлык, Н. Г. Аверина, ДАН, 186, 1209 (1969); 193, 1429 (1970); 213, № 1 (1973); Физиол. раст., 19, 487 (1972); 20, 725 (1973). ⁷ A. A. Шлык, Н. Н. Костюк, ДАН, 202, 707 (1972); 206, 1002 (1972). ⁸ A. A. Шлык, И. В. Прудникова и др., ДАН, 208, 472 (1973); 211, 744 (1973); в сборн. Генетические аспекты фотосинтеза, Душанбе, 1972, стр. 37. ⁹ D. J. Arnon, Plant Physiol., 24, 1 (1949). ¹⁰ М. К. Николаева, М. П. Власова, О. П. Осипова, Физиол. раст., 17, 5 (1970). ¹¹ М. Т. Чайка, И. В. Прудникова и др., В сборн. Метаболизм и строение фотосинтетического аппарата, Минск, 1970, стр. 144. ¹² P. V. Sane, D. J. Gooldchild, R. B. Park, Biochim. et biophys. acta, 216, 162 (1970). ¹³ C. J. Arntzen, R. A. Dilley et al., Biochim. et biophys. acta, 256, 85 (1972). ¹⁴ N. K. Boardman, Biochim. et biophys. acta, 283, 469 (1972). ¹⁵ D. G. Bishop, J. M. Bain, R. M. Smillie, J. Exp. Bot., 24, 361 (1973). ¹⁶ O. Machold, O. Aulich, Biochim. et biophys. acta, 281, 103 (1972).