

А. И. МАСЛОВ, Б. Б. ВАРТАПЕТЯН

ИНДУКЦИЯ ЦИАНИДРЕЗИСТЕНТНОГО ДЫХАНИЯ У ПРОРОСТКОВ РИСА

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 21 I 1974)

Способность прорасти в условиях полного исключения молекулярного кислорода является характерной особенностью семян риса. Как показали электронно-микроскопические исследования, клетки колеоптилей риса, выращенного в условиях строгой аноксии, обладают всеми клеточными структурами, характерными для аэробно выращенных растений, включая органеллы кислородного обмена — митохондрии (¹, ²). При перенесении таких колеоптилей в обычную атмосферу они начинают поглощать O₂ из окружающей среды (³, ⁴). Специально проведенные полярографические исследования показали недавно, что эта способность к дыханию свойственна действительно анаэробно выращенным проросткам, а не возникает вторично в результате кислородной индукции дыхательных ферментов после перенесения проростков из анаэробной в аэробную среду (⁵). Спектрофотометрические и гистохимические исследования подтвердили наличие у «анаэробных» колеоптилей цитохромов b, c, a (⁶).

В связи с обнаружением у анаэробно выращенных колеоптилей функционально активных митохондрий встал вопрос о биогенезе этих органелл, т. е. происходит ли в условиях строгой аноксии новообразование дыхательных ферментов митохондрий или они предсуществуют в эмбрионах исходных семян и в условиях аноксии лишь сохраняют свою активность в латентном состоянии. Авторы полагали, что одним из подходов к выяснению этого вопроса могло бы служить сравнительное изучение ингибирования хлорамфениколом (ХАФ) митохондриального белкового синтеза в процессе анаэробного и аэробного роста колеоптилей. Ниже приведены результаты экспериментов, показавших, что в зависимости от того, присутствует ли в среде прорастания кислород или его нет, хлорамфеникол по-разному действует на биогенез ферментов митохондрий и на дыхательную активность клеток. Значительный интерес представляет обнаруженный нами факт индукции ХАФ цианидрезистентного дыхания у колеоптилей, выросших при свободном доступе кислорода к проросткам.

В опытах использовали семена риса *Oryza sativa* (сорт Арпа Шалы), которые после тщательного промывания водой выдерживали 10 мин. в 0,1% растворе сулемы, затем вновь промывали их водой и проращивали на слое фильтровальной бумаги в темноте (27°). Проращивание в анаэробных условиях, длившееся 6 суток, проводили в асептических условиях в системах, описанных ранее (³). Анаэробноз создавали пропусканием

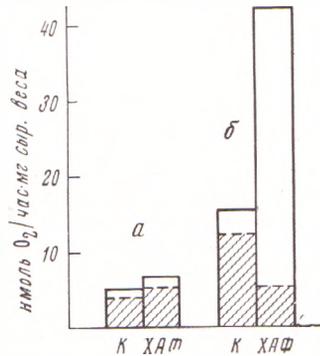


Рис. 1. Дыхание аэробных (б) и анаэробных (а) 6-суточных колеоптилей риса, выращенных на среде с ХАФ (0,5 мг/мл) и без ингибитора. Штриховой линией показано дыхание, ингибируемое 10^{-3} М KCN. К — контроль

через среду прорастания азота особой чистоты (примесь O_2 менее 0,003%) в течение 1,5 час. В опытах с ХАФ (фармацевтический препарат левомицетина 62% ХАФ) ингибитор добавляли в среду прорастания до концентрации 0,5 мг/мл.

Митохондрии выделяли из 6-суточных колеоптилей. Среда выделения содержала 0,5 М маннит, 0,1 М трис-НСl-буфер, рН 7,2, 0,001 М ЭДТА, 0,1% сывороточный альбумин, 0,05% цистеин (*). Проростки гомогенизировали в фарфоровой ступке. После фильтрования через полотно гомогенат центрифугировали при 1000 g 10 мин. Надосадочную жидкость центрифугировали при 10 000 g 15 мин. Осадок промывали один раз той же средой без цистеина и пересаждали при 10 000 g 10 мин.

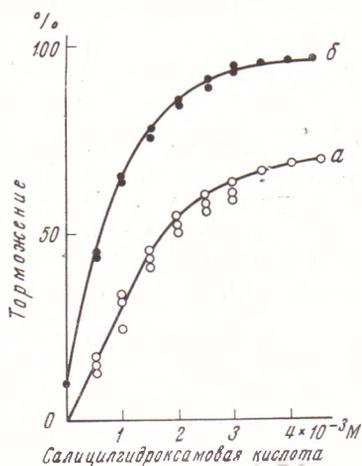


Рис. 2. Влияние салицилгидроксамовой кислоты на поглощение O_2 митохондриями 6-суточных проростков риса, выращенных на среде с ХАФ. В качестве субстрата — сукцинат. а — кривая титрования салицилгидроксамовой кислотой, б — кривая титрования в присутствии $10^{-3} M KCN$ (% от исходного поглощения)

битора. «Анаэробные» колеоптили, растущие в присутствии ХАФ, имеют интенсивность дыхания, близкую к контрольным. Чувствительность дыхания к цианиду в концентрации $10^{-3} M$ у них практически одинакова (80% у опытных и контрольных колеоптилей). Напротив, в аэробном варианте ХАФ вызывает как количественные, так и качественные сдвиги: интенсивность дыхания 6-суточных колеоптилей, растущих в присутствии ХАФ (при расчете на сырой вес), примерно в 3 раза превышает такую контрольных колеоптилей, причем повышенное поглощение кислорода более чем на 80% нечувствительно к цианиду ($10^{-3} M$). У контрольных цианидрезистентность составляет всего лишь 20% (рис. 1).

Рис. 2 показывает, что цианидустойчивость, обнаруживаемая на целых проростках, отражает устойчивость самих митохондрий к цианиду. В этих опытах митохондрии были выделены из 6-суточных колеоптилей, которые выращивали в присутствии ХАФ в среде и при свободном доступе к ним атмосферного кислорода. Рис. 2, а показывает торможение поглощения O_2 митохондриями в зависимости от концентрации в реакционной среде салицилгидроксамовой кислоты, которая является специфическим ингибитором альтернативной, цианиднечувствительной оксидазы растительных митохондрий (*). Салицилгидроксамовая кислота в концентрации $4 \cdot 10^{-3} M$ вызывает максимальный эффект и подавляет поглощение кислорода почти полностью, если вводится в реакционную среду совместно с KCN (рис. 2, б). Чувствительность этих митохондрий

Поглощение кислорода колеоптилями и митохондриями измеряли в полярографической ячейке с закрытыми платиновым и хлорсеребряным электродами. Дыхание тканей измеряли в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,2, согласно ранее описанной методике (*). Реакционная среда для измерения поглощения кислорода митохондриями содержала 0,3 М маннит, 0,05 М трис-НСl-буфер, рН 7,2, 0,01 М KH_2PO_4 , 0,005 М $MgCl_2$ (*). В аэробных условиях присутствие ХАФ в среде прорастания почти не отражается на росте колеоптилей риса. Однако рост листа и корня подавляется в значительной степени. Проростки, растущие в анаэробных условиях в присутствии ХАФ, практически не отличались морфологически от контрольных.

На рис. 1 показана интенсивность поглощения кислорода 6-суточными колеоптилями, выросшими в аэробных и анаэробных условиях на среде с ХАФ и без инги-

к KCN ($10^{-3} M$) составляет около 10%, тогда как дыхание контрольных митохондрий в тех же условиях подавляется цианидом на 90%.

Таким образом, результаты настоящей работы, предпринятой нами для выяснения вопроса о том, происходит ли новообразование дыхательных ферментов в митохондриях анаэробно выращиваемых проростков риса, говорят скорее против такой возможности, поскольку присутствие специфического ингибитора митохондриального белкового синтеза — хлорамфеникола существенно не сказывается на дыхании клеток. Если в действительности это обстоит именно так, то придется допустить, что митохондрии, переходя из зародышей семени в клетки проростка, далее в процессе последующего роста колеоптилей в бескислородной среде не увеличиваются в числе и не наращивают своей дыхательной мощи. В пользу этой точки зрения говорят также результаты более ранней нашей работы, в которой было обнаружено, что в процессе роста колеоптилей риса (с 3 до 7 дней) в условиях строгой аноксии не происходит увеличения поглощения O_2 (при пересчете на целый колеоптиль) ⁽⁵⁾.

Иное наблюдается, когда хлорамфеникол добавляется в среду прорастания в условиях свободного доступа молекулярного кислорода к проросткам. В этом случае обнаружена существенная перестройка дыхательного аппарата. Наряду с сильным увеличением интенсивности поглощения кислорода происходит снижение чувствительности к цианиду, что связано, вероятно, с резким увеличением в митохондриях риса альтернативной, цианидустойчивой оксидазы.

Наличие в митохондриях второго пути транспорта электронов на кислород, устойчивого к действию цианида, является интересной особенностью растительных митохондрий ^(9, 10). Соотношение двух путей транспорта различно для митохондрий из разных растительных источников. Альтернативный путь окисления изучается обычно на митохондриях из початков ароидных, которые обладают очень низкой чувствительностью к цианиду. Биогенез альтернативного пути исследуется на срезах запахающей ткани, выдерживаемых в аэробных условиях. В этом случае дыхание срезов становится нечувствительным к действию цианида ⁽¹¹⁾. Показано, что развитие цианидустойчивого дыхания в срезах связано с возникновением новых митохондрий, которые «тяжелее» предшествующих при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы и обладают большей резистентностью к цианиду ^(12, 13). Такие митохондрии обладают обоими цепями транспорта электронов, как и митохондрии ароидных ⁽¹⁴⁾.

Возможно, что и в случае риса, прорастающего в аэробной среде в присутствии хлорамфеникола, цианидустойчивое дыхание возникает во вновь образованных митохондриях. Тогда параллельно с развитием цианидустойчивого дыхания должно проявляться ингибирующее действие хлорамфеникола. Установлено, что при росте дрожжей на среде с хлорамфениколом не происходит образования тех цитохромов, для которых необходим митохондриальный белковый синтез, а именно цитохромов b и a. При этом число митохондрий возрастает, и они содержат лишь один спектрально различимый цитохром c ⁽¹⁵⁾. Если окажется, что эти закономерности имеют место и в случае риса, прорастающего в присутствии хлорамфеникола, то митохондрии этого объекта должны обладать уникальным свойством: будучи сильно дефицитными по цитохромному пути окисления, они могут иметь почти исключительно альтернативный путь окисления. Такие митохондрии могли бы явиться удобной моделью для изучения цианиднечувствительного дыхания растений.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Б. Б. Варганеян, И. Н. Андреева, И. П. Маслова, ДАН, т. 196, 1231 (1971).
² К. Ueda, Н. Tsuji, Protoplasma, v. 73, 203 (1971). ³ Б. Б. Варганеян, И. П. Маслова, И. Н. Андреева, Физиол. раст., т. 19, 106 (1972). ⁴ Н. Tsuji, Bot. Mag. Токуо, v. 85, 207 (1972). ⁵ Б. Б. Варганеян, А. И. Маслов, Физиол. раст. т. 21, 4 (1974).
⁶ Б. Б. Варганеян, А. И. Маслов и др., Физиол. раст., т. 20, 1279 (1973). ⁷ S. Malhotra, M. Spenser, J. Exp. Bot., v. 22, 70 (1971). ⁸ G. Schonbaum, W. Bonner et al., Plant Physiol., v. 47, 124 (1971). ⁹ D. Bendal, W. Bonner, Plant Physiol., v. 47, 236 (1971). ¹⁰ B. Storey, J. Bahr, Plant Physiol., v. 44, 126 (1969). ¹¹ D. Hackett, In: Control Mechanisms in Respiration and Fermentation, N. Y., 1963, 105. ¹² M. Nakano, T. Asahi, Plant Cell Physiol., v. 11, 499 (1970). ¹³ T. Asahi, R. Majima, Plant Cell Physiol., v. 10, 317 (1969). ¹⁴ H. Ikuma, Ann. Rev. Plant Physiol., v. 23, 419 (1972).
¹⁵ A. Linnane, D. Biggs et al., Aspects of Yeast Metabolism, Oxford, 1966, p. 217.