

УДК 581.143.28

БИОХИМИЯ

Н. П. КОРАБЛЕВА, Э. П. ЛАДЫЖЕНСКАЯ, Л. В. МЕТЛИЦКИЙ

ИЗУЧЕНИЕ СИНТЕЗА РНК И БЕЛКА В МЕРИСТЕМАХ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ И ДЕЙСТВИЯ НА ЭТИ ПРОЦЕССЫ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА ФЕНОЛЬНОЙ ПРИРОДЫ

(Представлено академиком А. И. Опариным 4 VII 1975)

Одним из наиболее важных процессов при окончании покоя растений является стимуляция активности белок-синтезирующего аппарата меристематических клеток (¹⁻⁶). Согласно современным представлениям регуляция этой активности находится под контролем природных регуляторов роста (⁷⁻⁹). Однако механизм действия природных регуляторов роста остается все еще мало изученным.

Задачей настоящей работы было изучение механизма действия регуляторов роста фенольной природы (кофейной кислоты и скополетина) на синтез РНК и белка в меристемах клубней картофеля во время глубокого покоя и перехода к активному росту. Изолированные из клубней апикальные меристемы инкубировали в зависимости от варианта опыта с кофейной кислотой (10^{-4} М), скополетином (10^{-4} М), актиномицином D (10^{-4} — 10^{-7} М) или циклогексимидом (20 и 10 мкг/мл), а также с мечеными предшественниками синтеза РНК ($2\text{-}^{14}\text{C}$ -урацил) и белка ($2\text{-}^{14}\text{C}$ -лейцин). По окончании инкубации ткани фиксировали горячим этанолом и отмывали от сорбированной радиоактивности. Гидролизат РНК получали моди-

Таблица 1
Скорость синтеза РНК в меристемах клубней картофеля

Время инкубации, мин.	Глубокий покой		Окончание покоя	
	расп/мин на 1 г сухого веса ткани	мкг урацила на 1 г сухого веса ткани	расп/мин на 1 г сухого веса ткани	мкг урацила на 1 г сухого веса ткани
10	1400	$1,4 \cdot 10^{-3}$	14200	$1,4 \cdot 10^{-2}$
20	7432	$7,4 \cdot 10^{-3}$	17158	$1,7 \cdot 10^{-2}$
30	39300	$3,6 \cdot 10^{-2}$	22800	$2,3 \cdot 10^{-2}$
60	79452	$7,9 \cdot 10^{-2}$	53508	$5,4 \cdot 10^{-2}$

фицированным методом Шмидта и Таннгаузера (¹⁰). Белок выделяли путем экстракции гомогената ткани 1% КОН с последующим пятикратным переосаждением трихлоруксусной кислотой (¹¹).

Первый этап работы состоял в изучении особенностей синтеза РНК и белка на разных этапах периода покоя. Полученные данные (табл. 1, рис. 1, 2) свидетельствуют о том, что во время глубокого покоя синтез РНК в меристемах полностью не подавлен, но идет с низкой скоростью. Увеличение продолжительности инкубации меристем с меченым урацилом от 10 до 30 мин. вызывает в этот период значительное увеличение скорости синтеза РНК. Дальнейшее увеличение продолжительности инкубации до 60 мин. приводит к гораздо менее заметному усилению синтеза РНК.

Во время окончания покоя при инкубации меристем с меченым урацилом в течение 10 мин. обнаруживается гораздо более интенсивный синтез РНК, чем в период глубокого покоя. Однако увеличение продолжительности инкубации с меченым предшественником в этом случае не приводит к столь резкому возрастанию синтеза РНК во время глубокого покоя. По-видимому, это связано с тем, что после окончания глубокого

покоя возрастает не только скорость синтеза, но и скорость распада РНК. В таком случае при увеличении продолжительности инкубации с меченым предшественником радиоактивность отражает суммарный процесс синтеза и распада РНК.

Это предположение подтверждается результатами изучения скорости метаболизма РНК во время глубокого покоя меристем и при его окончании (рис. 1). В опытах определяли величину подавления синтеза белка ингибитором синтеза РНК — актиномицином D в зависимости от продолжительности инкубации меристем с этим антибиотиком.

Во время глубокого покоя актиномицин D подавляет синтез белка на значительную величину лишь при длительной инкубации (180 мин.). Следовательно, в этот период синтез белка в меристемах происходит на метаболически стабильных РНК. При окончании покоя актиномицин снижает синтез белка гораздо быстрее и на большую величину. Таким образом, как мы и предполагали, окончание покоя связано не только с увеличением скорости синтеза, но и с увеличением скорости обмена РНК. Кроме того, анализ данных, приведенных на рис. 1, показывает, что при окончании покоя в меристемах синтезируется более гетерогенный по скорости обмена набор РНК, чем в глубоком покое.

В отличие от синтеза РНК, синтез белка в меристематических тканях во время глубокого покоя происходит интенсивно (табл. 2). Даже при кратковременной инкубации с меченым предшественником (10 мин.) наблюдается значительный синтез белка. При окончании глубокого покоя скорость синтеза белка еще более возрастает.

Ранее мы сообщали (²) о результатах изучения действия природных регуляторов роста на синтез РНК в меристемах клубней картофеля. Обработка меристем во время глубокого покоя гибберелловой кислотой вызывала стимуляцию синтеза РНК, а абсцизовой кислотой, кофейной кислотой и скополастином — подавление.

Дальнейшее изучение показало, что характер действия природных регуляторов роста на синтез РНК и белка зависит от физиологического

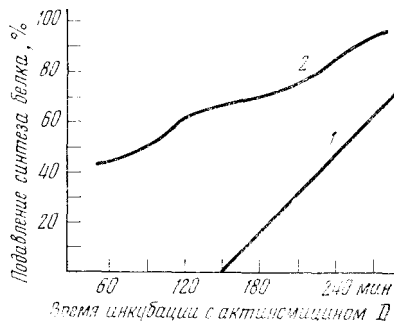


Рис. 1. Действие актиномицина D на синтез белка в меристематических тканях клубней картофеля в зависимости от времени инкубации. 1 — глубокий покой, 2 — окончание покоя

Таблица 2

Синтез белка в меристемах клубней картофеля

Время инкубации, мин.	Глубокий покой		Окончание покоя	
	расп/мин на 1 г сухого веса ткани	мкг лейцина на 1 г сухого веса ткани	расп/мин на 1 г сухого веса ткани	мкг лейцина на 1 г сухого веса ткани
10	10068	$2,6 \cdot 10^{-2}$	23684	$8,7 \cdot 10^{-2}$
20	55480	$2,1 \cdot 10^{-1}$	194737	$6,7 \cdot 10^{-1}$
30	65438	$2,4 \cdot 10^{-1}$	237720	$8,0 \cdot 10^{-1}$

состояния ткани. Так, во время глубокого покоя кофейная кислота подавляет синтез белка, а при окончании глубокого покоя ингибирующее действие заметно ослабевает. На разных стадиях вынужденного покоя кофейная кислота стимулирует синтез белка, а при прорастании практически не действует на этот процесс (рис. 2а). Аналогичная зависимость прослеживается и для скополастина (рис. 2б).

Полученные данные позволяют отнести к числу показателей изменения метаболизма меристем при переходе от покоя к росту усиление синтеза РНК и белка и изменение чувствительности белок-синтезирующего аппарата к действию природных регуляторов роста. Для изучения взаимо-

связи между этими явлениями мы провели сравнение влияния кофейной кислоты и скополетина на синтез белка в меристематических тканях, предварительно обработанных ингибиторами синтеза РНК и белка — актиномицином D и циклогексимидом. Оказалось, что характер действия актиномицина D и циклогексимида также зависит от физиологического состояния ткани. Во время глубокого покоя оба вещества подавляют синтез белка, при окончании покоя их ингибирующее действие уменьшается, а во время вынужденного покоя актиномицин и циклогексимид стимулируют синтез белка (рис. 2а, б). Необходимо отметить, что стимулирующее действие

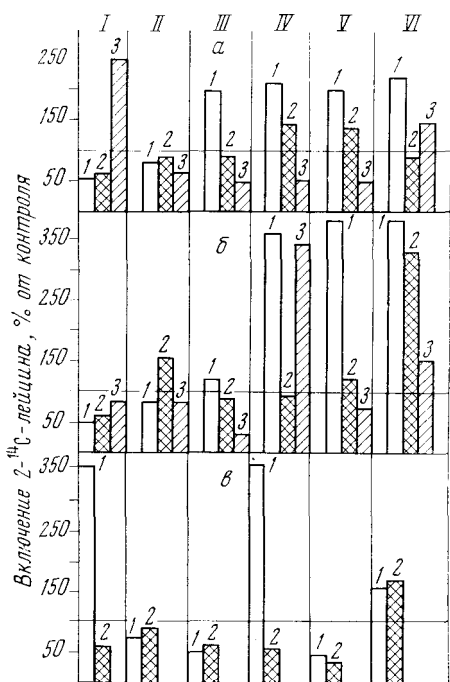


Рис. 2. Действие фенольных ингибиторов роста картофеля на ингибиторов синтеза РНК и белка на синтез белка в меристематических тканях клубней картофеля. а — кофейная кислота и актиномицин D, б — скополетин и циклогексимид. Изолированные из клубней точки роста обрабатывали: 1 — 10 мин. актиномицином D (а), циклогексимидом (б), затем последовательно по 10 мин. ледяной дистиллированной водой и $2\text{-}^{14}\text{C}$ -лейцином; 2 — 10 мин. кофейной кислотой (а), скополетином (б) и после их удаления 10 мин. $2\text{-}^{14}\text{C}$ -лейцином; 3 — 10 мин. актиномицином D (а), циклогексимидом (б), затем последовательно по 10 мин. кофейной кислотой (а), скополетином (б) и $2\text{-}^{14}\text{C}$ -лейцином. в — действие кофейной кислоты и скополетина на синтез белка в обработанных актиномицином D и циклогексимидом тканях. Изолированные из клубней точки роста обрабатывали: 1 — 10 мин. циклогексимидом, затем последовательно по 10 мин. кофейной кислотой и $2\text{-}^{14}\text{C}$ -лейцином; 2 — 10 мин. актиномицином D, затем последовательно по 10 мин. скополетином и $2\text{-}^{14}\text{C}$ -лейцином. Концентрация актиномицина D при обработке меристем в глубоком покое 10^{-4} M, во всех остальных случаях 10^{-7} M; циклогексимида 10 мкг/мл, кофейной кислоты 10^{-4} M и скополетина 10^{-4} M. I — глубокий покой; II — окончание покоя; III—IV — последовательные этапы вынужденного покоя

наблюдается лишь при низкой концентрации и кратковременной обработке ингибиторами (10^{-7} M и 10 мкг/мл соответственно, 10 мин.).

Парадоксальный, на первый взгляд, факт стимуляции синтеза белка ингибиторами синтеза РНК и белка был отмечен ранее для тканей растений, а также у животных и микроорганизмов ($^{12-14}$). Согласно гипотезе Томкинса (17), в клетках могут синтезироваться различные быстрообменивающиеся белки-ингибиторы трансляции медленно метаболизирующих мРНК. Кратковременная обработка ткани актиномицином D или циклогексимидом приводит к подавлению синтеза белков-ингибиторов такого рода и к стимуляции считывания мРНК, ранее репрессированных этим белком.

Не исключено, что и в меристемах клубней картофеля на каждом из этапов периода покоя синтезируются специфические белки-регуляторы. Результаты изучения действия кофейной кислоты и скополетина на синтез белка в обработанных актиномицином D или циклогексимидом тканях позволяют предположить, что такие белки, видимо, определяют характер действия этих регуляторов роста (стимуляцию или подавление) (рис. 2). Так, во время глубокого покоя кофейная кислота подавляет синтез белка в меристемах (так же, как и актиномицин D и циклогексимид), а в тка-

нях, обработанных этими антибиотиками, кофейная кислота стимулирует синтез белка. По-видимому, в период глубокого покоя на стабильных матрицах РНК синтезируется быстрообменивающийся белок (табл. 1, 2), способствующий ингибирующему действию кофейной кислоты. Этим, возможно, и объясняется интенсивный синтез белка в период глубокого покоя меристем (табл. 2), когда не происходит практически ни деления, ни растяжения клеток в апексах клубней. Актиномицин D и циклогексимида подавляют синтез этого белка и характер действия кофейной кислоты изменяется. При окончании глубокого покоя ингибирующее действие кофейной кислоты, актиномицина и циклогексимида на синтез белка ослабевает. Однако преинкубация меристем с ингибиторами макромолекулярного синтеза приводит к значительному увеличению ингибирующего действия кофейной кислоты. Можно предположить, что при окончании покоя в меристемах начинается синтез белка, противодействующего подавлению кофейной кислотой активности белок-синтезирующего аппарата. Актиномицин и циклогексимида подавляют образование этого белка, в результате чего ингибирующее действие кофейной кислоты восстанавливается. Во время вынужденного покоя кофейная кислота практически не действует на синтез белка, а актиномицин и циклогексимида стимулируют этот процесс. Но в тканях, предварительно обработанных антибиотиками, кофейная кислота вновь ингибирует синтез белка. Возможно, актиномицин и циклогексимида стимулируют в этот период синтез белков, способствующих ингибирующему действию кофейной кислоты. В интактных меристемах образование этих белков подавляется, вероятно, уже при окончании покоя, но обработка актиномицином и циклогексимидом вызывает стимуляцию их синтеза.

Аналогичным образом изменяется действие скополетина на синтез белка в преинкубированных с актиномицином либо циклогексимином тканях (рис. 2).

Сопоставление полученных данных позволяет сделать вывод, что в течение периода покоя и при переходе к росту в меристемах растений происходят не только количественные, но и качественные изменения в синтезе РНК и белка. Очевидно, на каждом из этапов периода покоя в меристематических тканях синтезируются специфические белки, определяющие характер действия природных регуляторов роста. Какова природа этих белков, механизм регуляции их синтеза и взаимодействия с регуляторами роста — на все эти вопросы должны быть получены ответы в дальнейших исследованиях.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
30 VI 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Л. В. Метлицкий, Н. П. Кораблева, Биохимия покоя запасющих органов растений, М., «Наука», 1965.
- ² Н. П. Кораблева, Э. П. Ладыженская и др., Иммуниет и покой растений, М., «Наука», 1972.
- ³ A. Marcus, J. Feeley, J. Biol. Chem., v. 240, 1675 (1965).
- ⁴ A. Marcus, J. Feeley, Proc. Nat. Sci. U.S.A., v. 56, 1770 (1966).
- ⁵ Н. А. Гумилевская, Е. Б. Кулаева и др., Биохимия, т. 37, 312 (1972).
- ⁶ Н. А. Гумилевская, Е. Б. Кулаева и др., Биохимия, т. 36, 277 (1971).
- ⁷ A. Trewavas, Progr. Phytochem., v. 1, 113 (1968).
- ⁸ J. L. Key, Ann. Rev. Plant Phys., v. 20, 449 (1969).
- ⁹ Н. П. Кораблева, Э. П. Ладыженская и др., Сб.: Иммуниет и покой растений, М., «Наука», 1972.
- ¹⁰ Б. Ф. Ванюшин, Сб.: Современные методы в биохимии, М., «Наука», 1964.
- ¹¹ А. М. Кузин, Сб.: Метод меченых атомов в биологии, М., Изд-во МГУ, 1965.
- ¹² I. N. Ihle, L. Dure, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 38, 995 (1970).
- ¹³ О. Н. Кулаева, Цитокинины, их структура и функция, М., «Наука», 1973.
- ¹⁴ О. Н. Кулаева, Н. Л. Клячко, Физиол. раст., т. 14, 926 (1967).
- ¹⁵ G. M. Tomkins, T. D. Gelehrter et al., Science, v. 166, 3912 (1969).