

2. Taylor N.L., Heazlewood J.L., Day D.A., Millar A.H. Differential impact of environmental stresses on the pea mitochondrial proteome // Mol. Cell. Proteomics. – 2005. – Vol. 4. – P. 1122 – 1133.
3. Van Aken O, Giraud E, Clifton R, Whelan J. Alternative oxidase: a target and regulator of stress responses // Physiol. Plant. – 2009. – Vol. 137. – P. 354 – 361.

СИСТЕМА СИНТЕЗА И ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ ПРОТОХЛОРОФИЛЛИДА ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ ПРОЦЕССОВ ДЫХАНИЯ В ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКАХ ЯЧМЕНЯ

Евдокимова О.В., Кабашникова Л.Ф., Савченко Г.Е.

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
Минск, Беларусь, ewdokimova@inbox.ru*

Регуляция энергетического обеспечения биогенеза фотосинтетического аппарата – одна из важных проблем мембранной биофизики растений, тесно связанных с изучением механизмов взаимодействия внутриклеточных органелл. Интересным объектом для ее исследования являются этиолированные проростки злаков, накапливающие предшественник хлорофилла (Хл) – протохлорофиллид (Пд). Пд депонируется в мембранах этиопластов в виде длинноволновой фотоактивной формы (максимум флуоресценции при 657 нм) в составе комплексов с ферментом Пд-оксидоредуктазой (ПОР) и НАДФН, а также не содержащей кофермента неактивной коротковолновой формы (максимум при 633 нм) [1]. Известно, что соотношение форм Пд в изолированных этиопластах изменяется под влиянием экзогенной АТФ [2]. В нашей работе мы попытались оценить влияние нарушений энергетических процессов в клетке на ранние стадии биосинтеза Хл по спектральным характеристикам Пд, его способности к фотовосстановлению и ресинтезу *in vivo*.

Исследования проводили на 7-дневных проростках ячменя (сорт Гонар), выращенных при 22°C в темноте. Срезанные листья переносили на 3 ч на водопроводную воду (контроль), ингибитор гликолиза фторид натрия (50 мМ) и ингибитор цитохром-с-оксидазы азид натрия (5 мМ). В конце инкубации листья освещали 1 мин светом люминесцентной лампы (30 мкМоль м⁻² с⁻¹) и вновь помещали в темноту. Изучали спектральные превращения пигментов (спектрофлуориметр “Solar CM 2203”, Беларусь) и изменение их содержания в ацетоновых экстрактах.

Инкубация срезанных листьев в течение 3-х ч в темноте на растворе обоих ингибиторов вызывала возрастание относительного содержания Пд633, особенно заметное при действии фторида (рис. А). Подобное явление наблюдали и в изолированных этиопластах в отсутствие экзогенной АТФ в работе [2]. Несмотря на это, фотовосстановление Пд протекало во всех вариантах с высокой эффективностью (таблица), что указывает на отсутствие прямого действия ингибиторов на активность ПОР. Освещение во всех случаях приводило к появлению длинноволновой формы Хл695 (рис.Б).

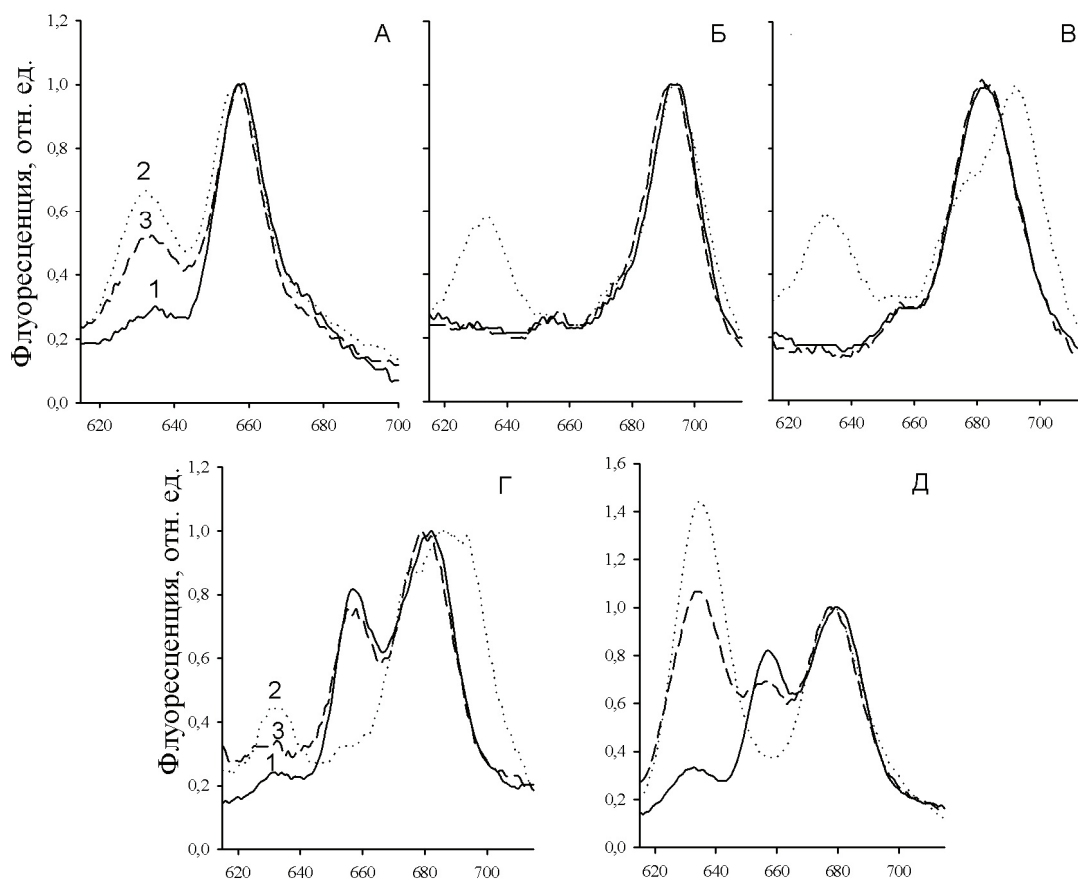


Рисунок – Низкотемпературные спектры флуоресценции ($\lambda_{\text{возб.}} 440 \text{ нм}$) этиолированных листьев ячменя после 3 ч инкубации в темноте (А); 1 мин освещения (Б) и последующего затемнения в течение 15 мин (В), 3 ч (Г) и 24 ч (Д): водный контроль (1), фторид натрия (2), азид натрия (3).

В контрольном образце и в варианте с азидом натрия через 15 мин максимум свечения Хл смещался к 684 нм, демонстрируя завершение сдвига Шибаты [3]. Фторид замедлял сдвиг: через 15 мин после освещения в спектрах обнаружено лишь небольшое плечо в области 684

нм на фоне основного максимума при 694 нм. Предельный уровень накопления Пд (в основном, Пд657, рис. Г и Д) в контроле достигался уже к 3 ч затемнения и удерживался до 24 ч. В варианте с азидом через 3 ч затемнения содержание Пд было не меньше, чем в контроле, однако оно снижалось к 24 ч. При этом в первые 3 ч преобладала фотоактивная форма, но к 24 ч доминировал коротковолновый Пд. Значительное подавление ресинтеза Пд с явным разрушением пигмента после 24 ч наблюдали под действием фторида, где накапливался только Пд633.

Таблица – Содержание протохлорофиллида и хлорофилла *a* (мкг/г сухой массы) в этиолированных листьях ячменя после инкубации на растворах ингибиторов в течение 3 ч.

Условия эксперимента	Контроль		Фторид натрия		Азид натрия	
	Пд	Хл <i>a</i>	Пд	Хл <i>a</i>	Пд	Хл <i>a</i>
До освещения	96,8±5,7	0	93,57±5,4	0	101,6±6,9	0
1 мин освещения	38,7±4,3	53,2±5,4	40,3±9,2	61,3±4,1	34,8±7,7	59,7±6,8
1 мин освещения +3 ч затемнения	74,2±8,5	67,8±5,6	44,2±7,3	58,0±4,8	68,04±11,2	71,28±3,2
1 мин освещения + 24ч затемнения	74,4±6,5	55,0±3,2	24,66±3,8	32,2±3,8	58,37±5,3	53,0±2,7

Таким образом, ингибирование дыхательного процесса (особенно гликолиза), вероятно, приводило к дефициту НАДФН, необходимого для ресинтеза фотоактивной формы Пд. Объяснить влияние ингибиторов, особенно азид натрия, на содержание НАДФН сложно, поскольку его источником в отсутствие фотосинтеза в растениях является пентозофосфатный цикл. Однако представляется возможной сцепленность в изменении содержания двух энергетических эквивалентов (АТФ и НАДФН) при ингибировании гликолиза и дыхания митохондрий.

Литература

1. Беляева О.Б., Литвин Ф.Ф. Фотоактивные пигмент-ферментные комплексы предшественника хлорофилла в листьях растений // Успехи биологической химии. – 2007. – Т. 47. – С.189 – 232.
2. Horton P., Leech M.R. The effect of ATP on the photoconversion of protochlorophyllide in isolated etioplasts of *Zea mays* // Plant Physiol. – 1975. – Vol. 56. – P. 113 – 120.

3. Shibata K. Spectroscopic studies on chlorophyll formation in intact leaves // J. Biochem. – 1957. – Vol. 44. – P. 147 – 173.

СИНТЕЗ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ, ПРОТОХЛОРОФИЛЛИДА И ХЛОРОФИЛЛА ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ ПРОЦЕССОВ ДЫХАНИЯ

Евдокимова О.В., Савченко Г.Е.

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
Минск, Беларусь, ewdokimova@inbox.ru*

В хлоропластах высших растений синтез 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) осуществляется из глутамата в C_5 -пути, включающем 3 этапа. На первом этапе глутаминовая кислота активируется путем присоединения к тРНК^{ГЛУ} в присутствии АТФ и Mg^{2+} , затем восстанавливается в НАДФН-зависимой реакции и, наконец, с помощью аминотрансферазы превращается в АЛК [1]. Основными источниками АТФ в этиолированных проростках является окислительное и субстратное фосфорилирование, а источником НАДФН – пентозофосфатный окислительный путь. Синтез глутаминовой кислоты в растительной клетке осуществляется из интермедиата цикла трикарбоновых кислот – α -кетоглутаровой кислоты. Т.о., лимитирующими факторами биосинтеза АЛК и, как следствие, торможения накопления хлорофилла могут быть как нарушение энергообеспечения хлоропластов, так и дефицит основного субстрата. В данной работе исследовали влияние нарушений дыхания на скорость синтеза АЛК, накопление протохлорофиллида (Пд) и хлорофилла (Хл) в постэтиолированных листьях ячменя.

Исследования проводили с 7-дневными проростками ячменя (сорт Гонар), выращенными при 22°C в темноте. Срезанные листья переносили на 3 ч на водопроводную воду (контроль), ингибитор гликолиза фторид натрия (50 мМ) и ингибитор цитохром-с-оксидазы азид натрия (5 мМ). В конце инкубации в одних экспериментах листья освещали 1 мин светом люминесцентной лампы (30 мкМоль $m^{-2} s^{-1}$) и вновь помещали на 3 ч в темноту для ресинтеза Пд. В других экспериментах после темновой инкубации на ингибиторах листья зеленели 3 ч на свету (120 мкМоль $m^{-2} s^{-1}$) на воде либо на растворе левулиновой кислоты (50 мМ) [2]. Известно, что инкубация листьев на растворе левулиновой кислоты на