

Р.М. ФОМІШИНА, О.О. СИВАШ, Т.О. ЗАХАРОВА,
О.К. ЗОЛОТАРЬОВА

Інститут ботаніки ім. М.Г.Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, МСП -1, 01601, Київ, Україна

**ВПЛИВ КЛІНОСТАТУВАННЯ
НА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ
МЕТАБОЛІЗМУ ТЕТРАПІРОЛЬНИХ
СПОЛУК ПРОРОСТКІВ
HORDEUM VULGARE L.**

Ключові слова: кліностатування, пігменти, хлорофілаза, дегідратаза δ-амінолевулінової кислоти, ячмінь.

Під час космічного польоту внаслідок впливу невагомості (мікрогравітації) та інших факторів у рослинах спостерігалися значні морфологічні зміни порівняно з контрольними, що росли в умовах земного тяжіння.

У рослин, вирощених у ході орбітального польоту, виявляється суттєва відмінність у швидкості росту коренів і паростків, поділі та диференціації клітин, процесах репродукції [11,12]. Зокрема, показано, що під впливом факторів орбітального польоту змінюється пігментний апарат рослин, у них значно знижується вміст хлорофілу *a* (Хла) і *b* (Хлб) відносно контрольних, вирощених на землі [5,19]. У зв'язку з цим припускають, що вплив мікрогравітації на розмір пулу хлорофілових пігментів може здійснюватися шляхом затримки їх біосинтезу або прискорення деструкції, катаболізму. Важливу роль при цьому може відігравати модуляція активності ферментів, відповідальних за біосинтез і гідроліз нативних хлорофілвмісних комплексів.

Одним із ферментів, що бере участь у регуляції метаболізму хлорофілу, є хлорофілаза (хлорофіл – хлорофілід – гідролаза 3.1.1.14). Цей фермент локалізований в обох фотосистемах [6] і каталізує гідроліз етерного зв'язку між фітолом і С-17³ групою пропіонової кислоти хлорофілів *a* і *b* з утворенням відповідних хлорофілідів і фітолу (рис. 1). Від активності ферменту залежать вміст хлорофілу, розклад і накопичення пігменту. Так, у певні періоди вегетації рослин, коли відбувається накопичення (в листках, плодах молодих особин), або гідроліз пігментів (у разі старіння рослин), а також під дією стресових факторів (тепловий шок, водний дефіцит, солове отруєння) активність хлорофілази зростала [4, 6, 7, 9, 13].

Вплив мікрогравітації на активність хлорофілази не вивчався.

До ферментів, що беруть участь у біосинтезі хлорофілу на початковій стадії, належить дегідратаза δ-амінолевулінової кислоти (АЛКД) (Е.С.4.2.24), відома також як порфобіліноген синтазу. За участю цього ферменту відбувається конденсація двох молекул δ-амінолевулінової (5-амінолевулінової) кислоти (АЛК) з утворенням монопіролу – порфобіліногену (ПБГ) (рис 2). У разі кон-

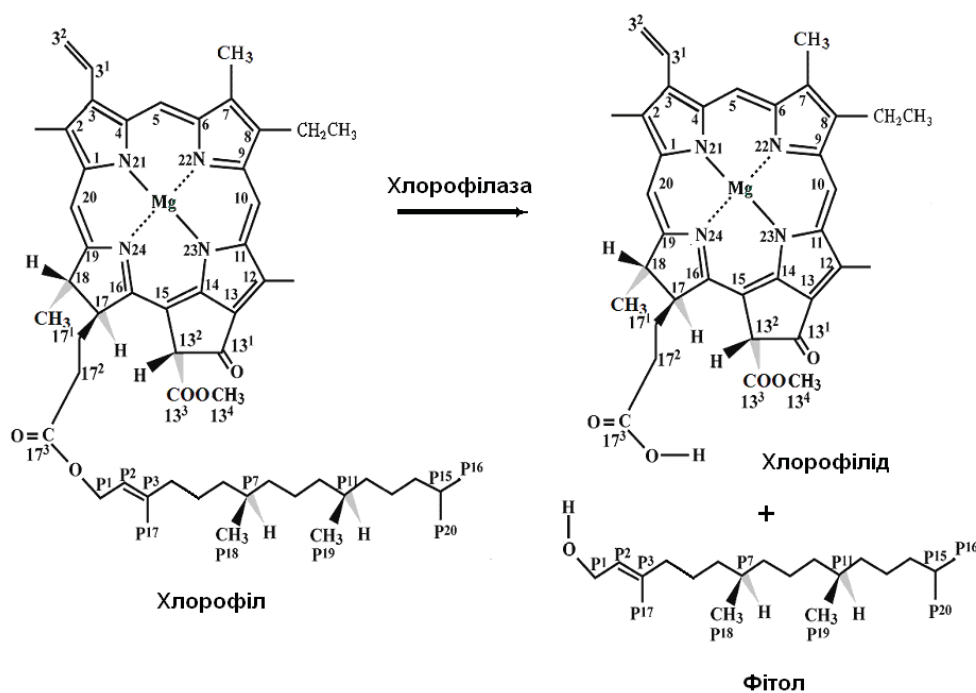


Рис. 1. Схема хлорофілазної реакції

денсації чотирьох молекул ПБГ утворюється порфіринове кільце, яке шляхом цілого ряду ферментативних перетворень і включення магнію в макроцикл, трансформується в протохлорофілід і, зрештою, – хлорофіл [1, 18].

Дані про вплив мікрогравітації на активність δ -амінолевулінат-дегідратази досі відсутні.

Мета даного дослідження – з'ясувати вплив кліностакування на процеси біосинтезу хлорофілу, для чого було здійснене порівняльне вивчення активності хлорофілази, АЛКД, вмісту пігментів та їх співвідношення у листках ячменю при вирощуванні рослин за умов кліностакування.

Об'єкти та методи досліджень

Проростки *Hordeum vulgare L.* вирощували на базальтовому волокні з додаванням поживного розчину «Вермистин» при температурі 23–25 °С. Контрольні рослини зростали у вертикальному положенні, а дослідні проростки постійно перебували в умовах повільного горизонтального кліностакування (4 об./хв). У першій серії дослідів рослини зростали протягом 7 діб в умовах освітлення під люмінесцентними лампами ЛБ–40 при густині потоку фотонів на рівні рослин 90–120 мкмоль·м⁻²·с⁻¹. У другій серії дослідів проростки вирощували протягом 6 діб у темноті за тих же умов живлення, температури та положення контрольних і дослідних варіантів. Потім проростки ячменю для зеленіння виставляли на 1 добу під люмінесцентні лампи при густині потоку фотонів на рівні рослин 90–120 мкмоль·м⁻²·с⁻¹. Щільність

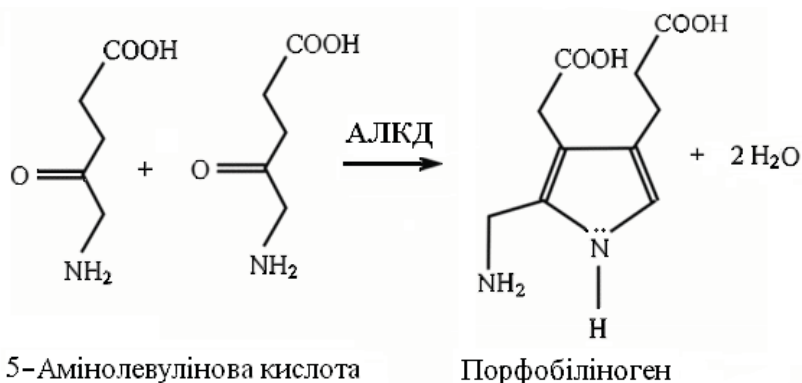


Рис. 2. Схема біосинтезу порфобіліногену

поток фотонів на рівні рослин визначали за допомогою сферичного мікроквантового сенсора US-SQS та вимірювального пристрою LI-COR (LI-250), США.

Для вивчення активності АЛКД використовували лише етіольовані однотижневі проростки ячменю.

Вміст пігментів (хлорофіл *a*, *b*, каротиноїди) визначали в ацетоновому екстракті пігментів на спектрофотометрі СФ-46 і розраховували за формулою Хольма-Ветштейна [3].

Для дослідження активності хлорофілази отримували препарат ферменту у вигляді ацетонового порошку. Субстратом слугував ацетоновий екстракт хлорофілу з листя кропиви. Активність хлорофілази визначали в 40%-ному водному розчині ацетону (рН 7,17) за методом О.Г. Судьїної [8] і розраховували за різницею в кількості хлорофілу *a* в контролі (субстрат без ферменту) і досліді (з ферментом).

Активність АЛКД визначали за методом (Mauzerall and Granick) [16]. Наважку етіольованого матеріалу розтирали у ступці з середовищем виділення (0,33 М сорбітол, 40 мМ НЕРЕС, рН 7,8, 5мМ MgCl₂, 0,1% ізоаскорбат натрію), охолодженим до 0 °С. До отриманого екстракту додавали АЛК у концентрації 5 мМ та інкубували протягом 30 хв при 37 °С. Реакцію зупиняли, додаючи трихлороцтову кислоту, після чого розчин центрифугували для осадження білка і до надосадкової рідини додавали реактив Ерліха. Після 5 хвилинної преінкубації вимірювали оптичну густину на спектрофотометрі СФ-46 (ЛОМО, ССРСР) при довжині хвилі 553 нм. Для визначення концентрації ПБГ використовували молярний коефіцієнт поглинання 6,2 10⁴ М⁻¹см⁻¹ [15].

Вміст ПБГ (мкг/мл) розраховували на одиницю білка, який визначали за методом (Bradford) [10].

Біохімічні дослідження проводили в 3-4-кратній повторності, результати обробляли статистично, стандартні відхилення не перевищували 5 %.

Результати досліджень та їх обговорення

У табл. 1 наведені дані про зміни вмісту основних фотосинтетичних пігментів та активності хлорофілази в зелених 7-добових проростках ячменю, які виро-

щували за різних умов. Видно, що при кліноостатуванні вміст хлорофілу a і b і каротиноїдів значно нижчий, ніж у контролі. Так, кількість зелених пігментів і каротиноїдів у дослідних рослин у 1,2– 1,4 раза менша, ніж у контрольних. Отримані нами результати узгоджуються з уже згадуваними літературними даними і можуть свідчити про порушення динамічної рівноваги між синтезом і розпадом пігментів. Контрольні та дослідні рослини відрізнялися також співвідношенням Хл a/b . За умов кліноостатування це співвідношення трохи збільшувалося. У літературі є дані про те, що рослини, які вирощували в умовах орбітального польоту, мали таке саме співвідношення Хл a/b , як і контрольні, котрі перебували на Землі [5], або дещо нижче [19].

Співвідношення Кар/Хл($a+b$) в умовах нашого експерименту не змінювалося, тобто баланс між цими пігментами не порушувався.

Слід зауважити, що досліджувані варіанти відрізнялися також за морфологічними ознаками. Так, у контрольних рослин довжина проростків становила 16–17 см, тимчасом як у кліноостатованих – 10–14 см, крім того вони були більш тонкими і покрученими.

Дослідження активності хлорофілази в цьому експерименті дало змогу виявити (табл.1) значне зниження активності ферменту в кліноостатованих зелених 7-добових проростках ячменю: порівняно з контрольними рослинами – приблизно в 1,3 раза.

Отже, отримані дані про вміст пігментів і активність хлорофілази свідчать, що в молодих проростках, які росли вертикально (контроль), активніше відбувався метаболізм хлорофілів ($a+b$). У молодих проростків за умов симульованої мікрогравітації (кліноостатування) швидкість оновлення хлорофілу значно нижча. Можна припустити, що цей фактор негативно впливає на новоутворення молекул хлорофілу a і b і що порівняно з контролем кількість пігментів нижча, а швидкість їх оновлення менша.

Вплив кліноостатування на біосинтез фотосинтетичних пігментів досліджувався у процесі зеленіння етіологованих проростків. Відомо, що в темноті зелені пігменти не синтезуються, а починають накопичуватися після початку освітлення, оскільки утворення хлорофілу блокується на стадії фотовідновлення

Таблиця 1. Вміст пігментів (мг/г сухої речовини) та активність хлорофілази (мг розкладеного хлорофілу а/г сухої речовини) в кліноостатованих і контрольних зелених проростках ячменю

Пігменти, активність хлорофілази	Контроль	Дослід (кліноостатування)
Хлорофіл a	9,10 ± 0,16	7,51 ± 0,04
Хлорофіл b	3,85 ± 0,07	2,75 ± 0,11
Хл a/b	2,36	2,73
Каротиноїди	2,47 ± 0,1	2,01 ± 0,04
Кар/Хл($a+b$)	0,19	0,20
Активність хлорофілази	0,496 ± 0,002	0,365 ± 0,001

протохлорофіліду. Як видно з табл. 2, під час зеленіння рослин протягом 24 год вміст зелених пігментів досяг декількох мг/г сухої маси, причому в кліноостатованих рослин цей показник був у 1,2 нижчий, ніж у контрольних. Меншим був також вміст каротиноїдів. Є дані, що за умов невагомості зменшується не тільки кількість цих пігментів, а змінюється співвідношення індивідуальних каротиноїдів [2, 5]. Співвідношення Хл a/b в обох варіантах досліду було однаковим, проте співвідношення Кар/Хл($a+b$) у контролі виявилось нижчим.

Активність хлорофілази після зеленіння протягом доби в обох варіантах трохи нижча, ніж у попередньому експерименті, де рослини зростали на світлі протягом семи діб. Причому в кліноостатованих проростків вона залишалася в 1,2 раза нижчою, ніж у контролі.

Отже, в зеленіючих листках вплив кліноостатування на фотосинтетичний апарат виявляється у зниженні рівня біосинтезу пігментів і швидкості їх оновлення.

Щоб з'ясувати, як впливає кліноостатування на початкову стадію біосинтезу тетрапірольних пігментів, досліджували активність АЛКД, за участю якої відбувається конденсація АЛК у ПБГ. Для цього ми вводили екзогенну АЛК (субстрат) до екстракту, отриманого з етіюльованих проростків ячменю. Проведення експерименту з етіюльованим матеріалом дозволяє виключити світлову регуляцію синтезу хлорофілу. Виявилось, що екстракти, отримані з контрольних і дослідних рослин, відрізнялися за вмістом ПБГ (табл. 3). У контролі його було на 8–26 % більше порівняно з дослідом, тобто активність АЛКД у контролі вища, ніж у кліноостатованих проростків.

Таблиця 2. Вміст пігментів (мг/г сухої речовини) та активність хлорофілази (мг розкладеного хлорофілу a /г сухої речовини) в кліноостатованих і контрольних зеленіючих проростках ячменю

Пігменти, активність хлорофілази	Контроль	Дослід
Хлорофіл a	4,73 ± 0,08	4,05 ± 0,05
Хлорофіл b	1,87 ± 0,01	1,61 ± 0,02
Хл a/b	2,53	2,52
Каротиноїди	1,21 ± 0,05	0,98 ± 0,02
Кар/Хл($a+b$)	0,18	0,20
Активність хлорофілази	0,378 ± 0,001	0,308 ± 0,06

Таблиця 3. Активність АЛКД у кліноостатованих і контрольних проростках ячменю (у відсотках до контролю)

№ досліду	Контроль	Кліноостатування
1	100	73,8
2	100	91,7
3	100	88,4
4	100	89,8

У літературі відмічалось значне інгібування активності АЛКД під дією різних стресових факторів на фоні зменшення вмісту пігментів, наприклад, у кукурудзи за умов затоплення [14], в листках редису в разі дії важких металів (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+}) [17].

У праці К.П. Довбиш зі співавторами [2] наведено дані про зменшення протохлорофіліду в кліноостатованих проростках ячменю на 8–10 %.

Отже, негативний вплив кліноостатовування на формування фотосинтетичного апарату виявляється як на початковій, так і на заключній стадіях біосинтезу пігментів. Унаслідок дії цього фактора відбувається зменшення фонду хлорофільних пігментів і зміна інтенсивності їхнього метаболізму.

Активність досліджуваних нами ферментів у рослин, вирощених в умовах кліноостатовування, була значно нижчою, чим, можливо, й обумовлений низький вміст хлорофілових пігментів за умов імітованої мікрогравітації.

1. Гоман Н.М., Радюк М.С., Фрадкін Л.И. Регуляція синтезу протохлорофіліда из 5-амінолевулінової кислоти в ході зеленіння етіолірованих листків ячменю // ДАН Білорусі. – 2000. – **44**, № 5. – С. 77–80.
2. Довбиш К.П., Золотарьова О.К., Сиваш О.О. Вплив кліноостатовування на формування фотосинтетичного апарату ячменю *Hordeum vulgare* // ДАН України. – 2005 – N 9. – С. 166 – 177.
3. Методи біохімічного аналізу рослин // Изд-во Ленінград. Гос. Ун-та, Ленінград. – 1978. – 192 с.
4. Пишбытко Н.Л., Калитуха Л.Н., Жаворонкова Н.Б., Кабашикова Л.Ф. Состояние фонда хлорофилловых пигментов в проростках ячменя разного возраста в условиях теплового шока и водного дефицита // Физиол. раст. – 2004. – **51**, № 1. – С. 20–26.
5. Румянцева В.Б., Мерзляк М.Н., Машинский А.Л., Нечитайло Г.С. Влияние факторов космического полета на пигментный и липидный состав растений пшеницы // Космич. биол. и авиакосмич. медицина – 1990. – N 1. – С. 53–55.
6. Судьина Е.Г., Лозовая Г.И., Довбиш Е.Ф. и др. К вопросу о локализации хлорофиллазы в хлоропласте // Физиол. и биохим. культ. раст. – 1973. – **5**, № 2. – С.154 –158.
7. Судьина О.Г., Голод М.Г., Довбиш К.П., Байдулова-Бабко Т.Ю. Динаміка вмісту пігментів та хлорофілазної активності різних білкових фракцій в онтогенезі листка // Укр. ботан. журн. – 1976. – **33**, № 2. – С. 132–136.
8. Судьина О.Г., Довбиш К.П., Голод М.Г., Фомішина Р.М. До питання про стан хлорофілази та її мінливість // Укр. ботан. журн. – 1975. – **32**, № 3. – С. 330–334.
9. Фомішина Р.М. Вплив засолення на пігментний апарат цукрового буряку // Укр. ботан. журн. – 1978. – **35**, № 6. – С. 652–656.
10. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding // Ann. Biochem. – 1976. – **72**, N 2. – P. 248–254.
11. Kordyum E.L. Biology of plant cells in microgravity and under clinostating // Int. Rev. Cytol. – 1997. – **171**, N1, – P. 1–78.
12. Kordyum E.L. Space biology and medicine: conception and experimental data, Space research in Ukraine 2000–2002 // National Space Agency of Ukraine / Ed. O. Fedorov, Print. House «KIT». – 2002. – P. 52–62.
13. Roca M., Minquez-Mosquera M.I. Involvement of chlorophyllase in chlorophyll metabolism in olive varieties with high and low chlorophyll content // Physiol. Plant. – 2003. – **117**, N 2. – P. 459–466.
14. Jamei R., Heidari R., Khara J., Zare S. The interaction effects of flooding and kinetin on growth criteria, chlorophyll content, and 5-aminolevulinic acid dehydratase activity in corn seedlings // Turk. J. Biol. – 2008. – **32**, N 2. – P. 253–257.

15. *Kaul K., Sabharwal P.S.* Kinetin-induced changes δ -aminolevulinic acid dehydratase of tobacco callus // *Plant Physiol.* — 1974. — **54**, N 3. — P. 644–648.
16. *Mauzerall D., Granick S.* The occurrence and determination of δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine // *J. Biol. Chem.* — 1956. — **219**, N 2. — P. 435–446.
17. *Morsch V.M., Schetinger M.R.C., Martins A.F., Rocha J.B.T.* Effect of cadmium, lead, mercury and zinc on δ -aminolevulinic acid dehydratase activity from radish leaves // *Biol. Plant.* — 2002. — **45**, N 1. — P. 85–89.
18. *Tanaka R., Tanaka A.* Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants // *Ann. Rev. Plant Biol.* — 2007. — **58**. — P. 321–46
19. *Volovik O.I., Kordyum E.L., Guykema J.A.* Some characteristics of photosynthetic apparatus under conditions of space flight // *J. Gravit. Physiol.* — 1999. — **6**, N 1. — P. 127–128.

Рекомендує до друку
І.В. Косаківська

Надійшла 21.10.2009

Р.Н. Фомишина, А.А. Сиваш, Т.О. Захарова, Е.К. Золотарева
Институт ботаники им. Н.Г.Холодного НАН Украины, г. Киев

**ВЛИЯНИЕ КЛИНОСТАТИРОВАНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ
МЕТАБОЛИЗМА ТЕТРАПИРРОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ.
ПРОРОСТКОВ *HORDEUM VULGARE* L.**

Изучалась активность хлорофиллазы, дегидратазы δ -аминолевулиновой кислоты, содержание пигментов и их соотношение у проростков *Hordeum vulgare* L. при клиностатировании. Выявлено значительное уменьшение активности хлорофиллазы в условиях клиностатирования на фоне снижения содержания пигментов. Отмечено также снижение активности дегидратазы δ -аминолевулиновой кислоты у клиностатированных проростков ячменя.

Полученные данные свидетельствуют об отрицательном влиянии клиностатирования как на начальные, так и заключительные стадии метаболизма тетрапиррольных соединений, что проявляется в уменьшении фонда хлорофиллов.

К л ю ч е в ы е с л о в а: клиностамирование, пигменты, хлорофиллаза, дегидратаза δ -аминолевулиновой кислоты, ячмень.

R.N. Fomishyna, O.O. Syvash, T.O. Zakharova, O.K. Zolotar'ova
M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

**EFFECT OF CLINOROTATION ON ACTIVITY OF ENZYMES OF TETRAPYRROLE
COMPOUNDS METABOLISM IN BARLEY (*HORDEUM VULGARE* L.) SEEDLINGS**

Chlorophyllase and δ -aminolevulinic acid dehydratase activities, pigments content in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings grown on the slow horizontal clinostat and vertical control were studied.

It was found that chlorophyllase activity markedly decline under clinorotation. Activity of δ -aminolevulinic acid dehydratase tested in the process of greening of etiolated barley seedlings was significantly lower in clinorotated plants than in control.

К e y w o r d s: clinorotation, pigments, chlorophyllase, δ -aminolevulinic acid dehydratase, barley.