

ЛИТЕРАТУРА

1. Авакян В. А., Варданян А. А. В сб.: Генетические последствия загрязнения окружающей среды, Вып. 3. с. 203. М., 1980 г.
2. Авакян В. А. Тез. докл. на заседании секции генетических аспектов проблем «Человек и биосфера» с. 2, Орджоникидзе, 1988.
3. Бабалян Р. О. С.-х. биология, 3, 473—475, 198.
4. Бегларян Н. П. Биолог. журн. Армении, 39, 10, 1986.
5. Гудков И. И. Клеточные механизмы посттрансляционного восстановления растений, 1985.
6. Луженцкая Н. И., Щербиков В. К. Радиобиология, 20, 200, 1, 1980.
7. Таджирян О. Х. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1990.
8. Kumar S., Indan J. Int. Plant recd. 27, 1, 1967.
9. Mait Singhani V. G., Kumar S. Genetics 71 (Supplement), 1973.

Поступила 10. I. 1992 г.

Биолог. журн. Армении, № 1 (47), 1994

УДК 591.1.05

ВЛИЯНИЕ СОЛЕВОГО СТРЕССА НА НАКОПЛЕНИЕ ПРОЛИНА В ВОДОРΟΣЛЯХ *CHLORELLA PYRENOIDOSA*

А. П. ГРИГОРЯН, А. Х. АГАДЖАНЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии и проблемная лаборатория сравнительной и эволюционной биохимии

Chlorella pyrenoidosa—сол. стресс—пролин

Причины накопления пролина в стрессовых условиях остаются далеко не установленными. Выявление механизма накопления пролина может внести ясность в различные аспекты вопроса адаптации растений.

Настоящая работа посвящена изучению некоторых сторон биосинтеза и накопления пролина у водорослей *Ch. pyrenoidosa* при выращивании их в нормальной среде роста и в среде, содержащей высокую концентрацию хлоридов натрия.

Материал и методики. Объектами исследования служили одноклеточные водоросли *Ch. pyrenoidosa*—82, полученные из Института агрохимических проблем и эволюции НАН Армении. Хлореллу выращивали на аппарате УИВ [2]. В процессе выращивания поддерживали температуру в пределах 28—30°. Культуру продували увлажненным воздухом, содержащим 2—3% CO₂.

Для выращивания хлореллы использовали стандартный раствор пития. Определение ферментов биосинтеза пролина проводили по методу, описанному нами ранее [1].

Экстракция свободного пролина и аминокислот. Для извлечения свободного пролина и аминокислот хлореллу растирали в ступке с 10-кратным количеством 80% ного этанола и экстрагировали на водной бане при 70° в течение 20 мин. Экстракт отделяли от осадка центрифугированием при 4000 об/мин, 10 мин.

Сокращения: АЛК-α—аминолевулиновая кислота.

Определение пролина. Проллин определяли как хроматографически, так и химическим методом. Хроматографическое определение проводили по методу Грабетовой и Тули [13], химическое—по Блюменкратцу [9]. Чувствительность метода составляет 1 мкг. К 1 мл образца добавляли 1 мл индикатора реагента (3 г индикриана в 180 мл ледяной уксусной кислоты и 20 мл формалина). Смесь кипятили 1 мин при 100° или 4 мин при 75° и охлаждали льдом. В качестве стандарта использовали пролин в концентрации 2 мкг/мл.

Определение глутамата. Глутамат определяли методом бумажной хроматографии—проявлением 0,2%-ным раствором индикриана в этаноле.

Пятна элюировали 5 мл 0,05%-ного C^1Cl_2 в 40%-ном этаноле. Плотность скрепки при определении пролина и глутамата определяли путем фотометрирования на фотоколориметре типа КФК—2 с длиной волны 540 мкм.

Результаты и обсуждение. Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что в присутствии хлористого натрия накопление пролина у *Ch. pyrenoidosa* по сравнению с контролем увеличивается в 2 раза.

Таблица 1. Влияние некоторых аминокислот на накопление пролина у хлореллы при ее выращивании в среде с хлористым натрием

В а р и а н т ы		Накопление сырой биомассы, мг	Накопление пролина, мкМ на 1 г сырого веса
Контроль	—	148	1.41±0.15
NaCl	$4.3 \cdot 10^{-3}$ М	184	2.83±0.35
В присутствии хлористого натрия (4.3410^{-3} М)	L-орн $4.7 \cdot 10^{-3}$ М	229	1.43±0.20
	L-про $6.9 \cdot 10^{-3}$ М	120	6.65±0.61
	α-кг $5.4 \cdot 10^{-3}$ М	113	5.65±0.64
	L-орн, α-кг	164	4.28±0.44
	L-глу $5.4 \cdot 10^{-3}$ М	102	5.46±0.72
В отсутствие хлористого натрия	L-орн $2.3 \cdot 10^{-3}$ М	114	5.51±0.68
	L-орн $4.7 \cdot 10^{-3}$ М	114	7.46±0.63
	L-орн $7.1 \cdot 10^{-3}$ М	103	7.46±0.70

Согласно литературным данным, аналогичное возрастание содержания пролина при солевом стрессе наблюдается также у одноклеточных зеленых водорослей *Ch. stigmatophora* [5], у других видов зеленых водорослей накопление пролина увеличивается в 10^1 раза [11]. Это свидетельствует о том, что в условиях засоления степень накопления свободного пролина в клетках водорослей зависит от их видовой принадлежности.

Некоторые исследователи причиной накопления пролина считают замедленное включение экзогенного меченого ^{14}C -пролина в белки и его превращение в глутамат и аргинин [7].

Данные табл. 1 показывают также, что из соединений, добавленных в среду с хлористым натрием, лишь орнитин способствует уменьшению накопления пролина у водорослей, доводя его содержание до

такового в контроле. Одновременно в указанном варианте наблюдается резкое увеличение биомассы подорослей по сравнению с остальными. Однако в среде без хлористого натрия, независимо от концентрации орнитина, приводит к повышению накопления пролина по сравнению с контролем и с вариантом с NaCl, при этом резко уменьшается биомасса волорослей. Это можно объяснить тем, что NaCl способствует накоплению пролина, а орнитин, по-видимому, являясь индуктором пролиноксидазы, приводит к интенсивному окислению накопившегося пролина, т. е. орнитин не расходуется при этом как субстрат для биосинтеза пролина. Индукция пролиноксидазы аргинином выявлена у жуков фасолевой зерновки (исодубл. данные нашей лаборатории), *Bacillus licheniformis* [12], а орнитином — у *Sacch. cerevisiae* [5]. Сказанное подтверждается еще и тем, что в присутствии орнитина и α -КГ пролина накапливается даже больше, чем в контроле и в варианте с NaCl. Увеличение накопления пролина в присутствии α -КГ может быть результатом восстановления его в глутамат и превращения последнего в пролин.

Мы исследовали также влияние некоторых метаболитических ядов на накопление пролина у *Ph. pyrenoidosa*. Полученные данные приведены в табл. 2.

Таблица 2. Влияние метаболитических ядов на накопление пролина в присутствии и в условиях отсутствия хлористого натрия у *Ch. pyrenoidosa*, мкМ про на 1 г ткани

		В а р и а н т ы	Накопление пролина
В присутствии хлористого натрия	NaCl	$4.3 \cdot 10^{-1}$ М	2.8 ± 0.04
	NaAsO ₄	$8 \cdot 10^{-4}$ М	2.2 ± 0.05
	NaAsO ₃	$2.5 \cdot 10^{-3}$ М	3.1 ± 0.04
	NaF	$4.1 \cdot 10^{-3}$ М	2.8 ± 0.04
	NaF	$8.2 \cdot 10^{-3}$ М	1.5 ± 0.03
	NaN ₃	$4.3 \cdot 10^{-3}$ М	0.7 ± 0.01
	NaN ₃	$1.3 \cdot 10^{-2}$ М	0
	CH ₃ COOH	$7 \cdot 10^{-1}$ М	0.2 ± 0.01
	H ₂ SO ₄	$2.3 \cdot 10^{-3}$ М	0.1 ± 0.01
	В отсутствие хлористого натрия	Контроль	
NaF		$4.1 \cdot 10^{-3}$ М	1.4 ± 0.02
NaF		$8.2 \cdot 10^{-3}$ М	0.6 ± 0.02
NaF		$2 \cdot 10^{-2}$ М	0.4 ± 0.01
NaN ₃		$4.3 \cdot 10^{-3}$ М	0
NaN ₃		$1.3 \cdot 10^{-2}$ М	0.7 ± 0.03
NaN ₃		$2.1 \cdot 10^{-2}$ М	0.2 ± 0.01
NaF		$1.04 \cdot 10^{-2}$ М	0.2 ± 0.01
NaN ₃		$1.07 \cdot 10^{-2}$ М	0

Видно, что применяемые ингибиторы дыхания и гликолиза значительно уменьшают накопление пролина, причем при сравнительно высоких концентрациях ингибиторов этот процесс не имеет места. Снижение синтеза пролина ингибитором гликолиза фтористым натрием свидетельствует о взаимосвязи между этими процессами.

Исследования показали, что фтористый натрий и азид натрия усиливают интенсивность биосинтеза пролина. Примечательно, что при выращивании водорослей в среде с аргинином и указанных соединений биосинтез пролина замедляется, по-видимому, вследствие ингибирования катаболизма аргинина и ограниченного снабжения аргинином, обеспечивающим биосинтез пролина.

Наряду с индуцированным аргинином аргинином и репрессией пролином, обнаруженными ранее нами у водорослей [3], это еще одно доказательство функционирования аргиназы в системе биосинтеза пролина у этих организмов.

В литературе нет единого мнения о включении пролина в молекулу хлорофилла. Одни исследователи накопление пролина у растений в экстремальных условиях считают результатом задержки его включения в молекулу хлорофилла [8], другие не видят связи между содержанием пролина и синтезом хлорофилла.

Известно, что в животных тканях порфириновое кольцо гема синтезируется из сукцината и глицина через АЛК, а у растений последняя образуется из глутамата превращением его в глутамил-1-фосфат, глутамил-1-полуальдегид, пирролин-5-карбоксилат и пролин [4]. Кофакторами первых двух реакций являются АТФ и НАДФН.

Для выявления взаимосвязи превращения глутамата в пролин, с одной стороны, и глутамата в АЛК — с другой, мы следили за изменением содержания пролина в водорослях при внесении в среду их выращивания глутамата, различных кофакторов и органических кислот на свету и в темноте. Результаты исследований свидетельствуют о том, что синтез пролина при выращивании водорослей из одного глутамата интенсивнее, чем при его сочетании с кофакторами и органическими кислотами. Это дает основание предположить, что в присутствии кофакторов превращение глутамата в пролин замедляется и имеет место его превращение в АЛК. Можно допустить, что предполагаемое другими авторами [10] включение пролина в пирроловое кольцо хлорофилла через АЛК не происходит, очевидно, у изученного нами объекта это происходит как у *Ch. vulgaris* [14], где включение глутамата в АЛК обнаруживается лишь при одновременном присутствии глутамата, АТФ, Mg^{2+} и НАДФН.

Высказанное мнение подтверждается и тем, что образование пролина из глутамата значительно подавляется при одновременном присутствии окисленного НАДФ, малата и нитрата. По-видимому, при этом восстановление НАДФ⁺ катализируемое НАДФ-зависимыми глутамат, малат и нитрат дегидрогеназами, приводит к восстановлению НАДФ, усилению превращения глутамата в АЛК с включением

последней в пирроловое кольцо хлорофилла. Этот процесс интенсивнее протекает в темноте, чем на свету. Причем образование пролина из глутамата более чем в три раза слабее в темноте, чем на свету.

Таким образом, синтез хлорофилла и биосинтез пролина в темноте и на свету протекают с разной интенсивностью, а именно на свету интенсивнее синтез пролина, а в темноте — синтез хлорофилла.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанян А. Х., Давтян М. А. Биолог. журн. Армении, 27, 19, 1974.
2. Владимирова М. Ф., Семеновко В. Е. Интенсивная культура одноклеточных водорослей. М.: 1962.
3. Григорян А. П., Агаджанян А. Х., Тамбян Н. Н., Давтян М. А. Биолог. журн. Армении, 41, 4, 1988.
4. Гудовик Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений. М., 1976.
5. Каликина Л. Г., Строгонова Б. П. Физиол. раст., 33, 46, 1984.
6. Мангашян Э. А. Биолог. журн. Армении, 37, 46, 1984.
7. Палфи Г., Бью М., Палфи Т. Физиол. раст., 30, 2, 1973.
8. Bongston C., Klockare B., Klockare R., Zanson S., Sundqvist C. Physioll. Pl. 43, 105 1978.
9. Blumenkranz A. Clin. biochem., 13, 4, 1980.
10. Breyhan Th., Hellinger F. Phytochemistry, 5, 811, 1966.
11. Brown J., Hellebust T. Can. J. Bot., 56, 676, 1978.
12. Zatshey E., Barnlohr R. I. Bacteriol., 98, 322, 1968.
13. Hrobetova E. Tury Z. J. Chromatogr., 3, 2, 199, 1960.
14. Weinstein T., Beall S. Arch. Biochem. Biophys., 237, 454, 1985.

УДК 586.2.

О ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ВНЕДРЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВА ВОДОРΟΣЛЕЙ В АРМЕНИИ

К. А. МИКАЕЛЯН, С. А. АЗАТЯН

Центр эколого-ноосферных исследований ИАН РА

Водоросли — перспективы применения

Нынешнее состояние республики — неблагоприятная экономическая ситуация, постоянная угроза экономической блокады, энергетический кризис, разваленная кормовая база — диктует необходимость улучшения условий окружающей среды, создания относительно дешевой и устойчивой базы для производства пищи и кормов.

В решении этих задач определенную роль может сыграть внедрение в хозяйство республики производства водорослей, которое относительно просто и не требует больших капитальных вложений.

К настоящему времени лучше изучены представители зеленых (*Chlorella*, *Scenedesmus*, *Chlamydomonas*) и сине-зеленых (*Spirulina*) водорослей, расширяются исследования и по другим видам.