

WPŁYW STREPTOMYCYNY NA SKŁAD BIAŁEK LAMELLARNYCH I AKTYWNOŚĆ  
FOTOCHEMICZNĄ CHLOROPLASTÓW LIŚCI KUKURYDZY

Marianna Król, Tadeusz Baszyński

Instytut Biologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej  
20-033 Lublin, ul. Akademicka 19

Streptomycyna wywołuje w chloroplastach trojakiemu rodzaju efekty fenotypowe: wpływa na grana i tylakoidy oraz związane z nimi ziarna skrobi i krople tłuszczów, na tworzenie się retikulum w plastydach oraz na zewnętrzny kształt tych organelli [21]. Antybiotyk ten hamuje wykształcenie się normalnej struktury lamellarnej plastydów [4, 5, 8, 18]. U roślin wyższych streptomycyna jest inhibitorem translacji. Hamuje ona syntezę białka na rybosomach typu prokariotycznego 70S chloroplastów [6, 10]. Z badań Macholda [10] wynika, że streptomycyna podobnie jak chloramfenikol hamuje syntezę kompleksów chlorofilowo-białkowych chloroplastów. Szczegółowsze badania Macholda i Auricha [12] wykazują, że główna komponenta kompleksu chlorofilowo-białkowego I syntetyzowana jest w chloroplastach. Miejscem syntezy kompleksu chlorofilowo-białkowego II są rybosomy 80S cytoplazmy. Przestrzenne rozdzielenie syntezy kompleksów chlorofilowo-białkowych sugeruje, że streptomycyna może wpływać na zróżnicowanie aktywności fotochemicznych I i II układu fotosyntezy. Problemowi temu poświęcony jest niniejszy komunikat.

#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na siewkach kukurydzy (*Zea mays* L. odm. SM 23). Nasiona pochodzące z Zakładu Doświadczalnego IHAR w Smolicach sterylizowano 70% alkoholem, płukano w wodzie destylowanej i moczo przez 24 godz w temp. 23°C w ciemności. Wykiełkowane na wilgotnej ligninie 3 dniowe rośliny umieszczano w luminostacie (16 godzin światła o intensywności 17 W·m<sup>-2</sup>).

W piątym dniu kiełkowania, gdy pierwszy liść przebił koleoptil, rośliny spryskano 0,5% wodnym roztworem streptomycyny. Spryskiwanie przeprowadzano 12 razy w ciągu dnia, co godzinę. Jednorazowo zużywano 20 ml roztworu streptomycyny na 60 roślin. Kontrolę stanowiły rośliny nie spryskiwane streptomycyną.

Po 15 dniach wzrostu (10 dni od czasu przebiccia koleoptila przez liść) rośliny spryskiwane roztworem streptomycyny wykazywały zróżnicowane zabarwienie. Wierzchołek liścia był zielony, niższe odcinki liścia jasno zielone zaś jego podstawa bezbarwna. Liście roślin kontrolnych nie wykazywały zróżnicowania barwy.

Do analiz brano drugi liść 15 dniowych roślin i dzielono go na 5 odcinków. Kolejne odcinki liścia oznaczono kolejno 1, 2, 3, 4 i 5 licząc od podstawy do wierzchołka. Chloroplasty izolowano z odcinków liści metodą Sane i in. [16]. Fotochemiczną aktywność I i II układu fotosyntezy oznaczano w sposób opisany wcześniej [9]. Zawartość chlorofilu oznaczano metodą Arnona [2]. Elektroforezę chloroplastowych białek lamellarnych przeprowadzano wg metody Remy'ego [14]. Żele wybarwiano 0,25% roztworem Coomassie brilliant. Densytogramy uzyskiwano przy pomocy densytometru Varian, długość fali 600 nm. Ciężar cząsteczkowy rozdzielonych białek wyznaczono wg Webera i Osborna [20]. Na jedną rurkę наносzono 30  $\mu$ g białka, którego ilość oznaczono metodą Schacterle i Pollacka [17].

### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Liście roślin jednoliściennych rozwijają się z podstawowego merystemu interkalarnego i z tego powodu są dogodnym materiałem pozwalającym prześledzić w nich poszczególne etapy rozwoju plastydów. Tkanki najmłodsze położone są u podstawy liścia zaś najstarsze bliżej jego wierzchołka. Badany w pracy rozwój aktywności fotosyntetycznej oraz występowanie chloroplastowych białek lamellarnych w poszczególnych odcinkach liścia kukurydzy jest odbiciem m.in. zróżnicowania wzdłuż liścia rozwoju struktury wewnętrznej chloroplastów.

Tabela 1 przedstawia zawartość chlorofilu w odcinkach liści kukurydzy. U roślin kontrolnych w wierzchołkowych odcinkach liści zawartość chlorofilu a i b jest około 4-krotnie większa aniżeli u podstawy liścia. Stosunek chlorofilu a/b nie ulega wzdłuż liścia

T a b e l a 1

Wpływ streptomycyny na zawartość chlorofilu w odcinkach liści kukurydzy

Roślina	Odcinek liścia	10 <sup>-3</sup> mg chl/			Stosunek chl <u>a</u> / <u>b</u>
		chl <u>a</u>	chl <u>b</u>	chl <u>a+b</u>	
Kontrolna	1	169,8	65,3	235,1	2,60
	2	501,2	195,5	696,7	2,56
	3	620,4	235,0	855,4	2,64
	4	692,7	239,6	982,3	2,88
	5	691,1	256,7	947,8	2,70
Spryskiwana streptomycyną	1	2,5	2,5	5,0	1,03
	2	8,7	6,3	15,0	1,38
	3	75,8	43,3	119,1	1,75
	4	220,7	124,5	345,2	1,77
	5	337,3	163,5	500,8	2,07

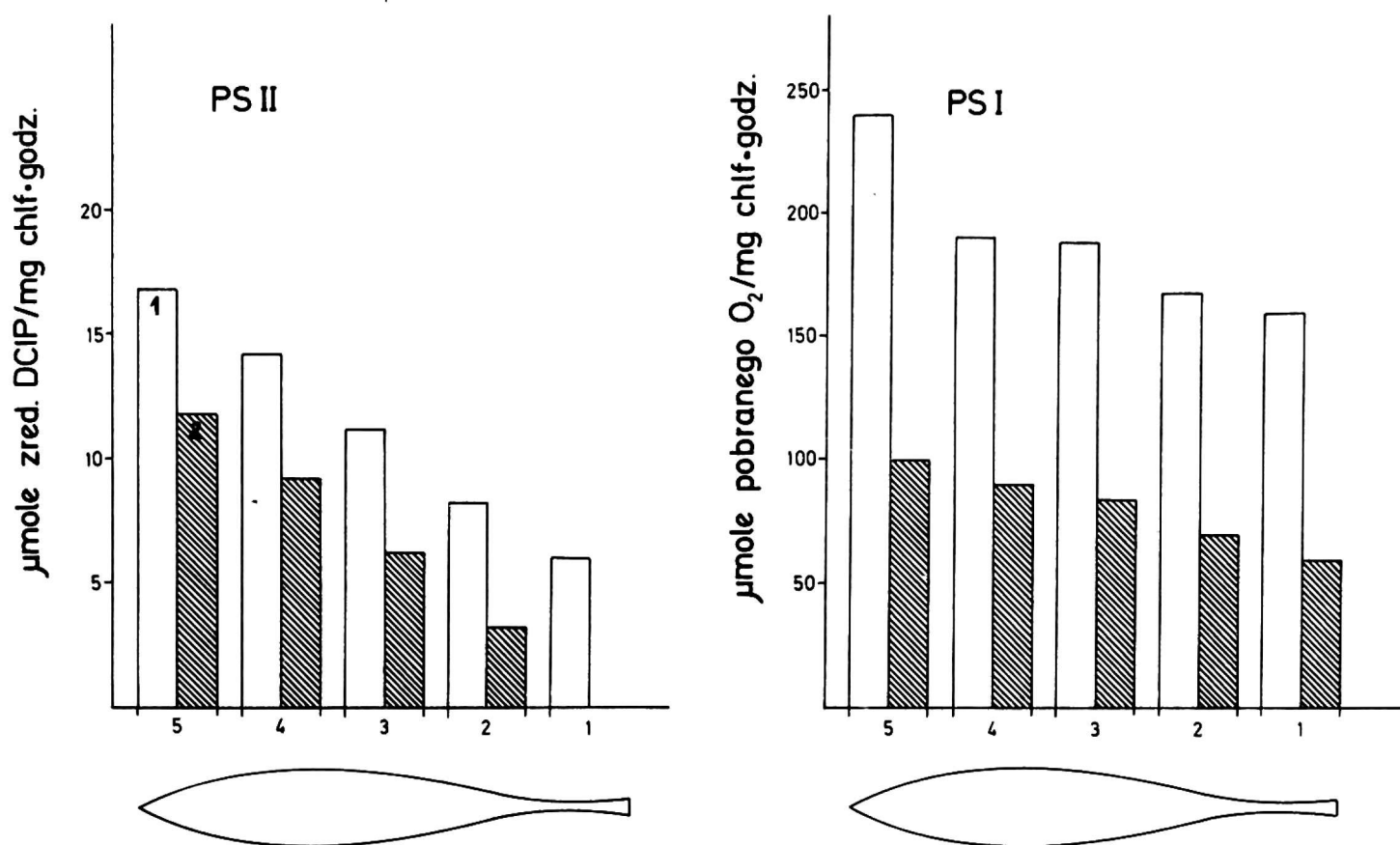
znaczniejszym zmianom. Ponieważ każdy odcinek liścia reprezentuje tkanki w różnym wieku można przyjąć za Robertsonem i Leatschem [15] że wiek determinuje syntezę chlorofilu.

Streptomycyna powoduje silne zahamowanie syntezy chlorofilu. Ponieważ działanie streptomycyny na roślinę powoduje występowanie na tym samym liściu tkanek o różnej budowie wewnętrznej plastydów [18] syntezę chlorofilu możnaby od niej uzależnić. Według Signola [18] wewnętrzna struktura plastydu ulega pod wpływem streptomycyny zmianie a zmiany te są tym bardziej widoczne im mniej rozwinięty był plastyd w momencie działania streptomycyny. Z tabeli 1 wynika, że u podstawy liścia traktowanego streptomycyną, gdzie występują plastydy we wczesnym stadium rozwoju, ilość chlorofilu jest ponad 100-krotnie mniejsza aniżeli w odcinku wierzchołkowym.

Interesujące jest około 2-krotnie silniejsze hamowanie syntezy chlorofilu a aniżeli chlorofilu b. Według Macholda i Stephana [11] streptomycyna hamuje głównie przejście koproporfirynogenu w protoporfirynogen. Zahamowanie syntezy chlorofilu b mogłoby być wynikiem wywołanego streptomycyną obniżenia puli chlorofilu a, lub pewnej jego formy będącej substratem w syntezie chlorofilu b. Na silniejsze hamowanie syntezy chlorofilu a aniżeli chlorofilu b wskazuje stosunek chlorofilu a/b w odcinkach liści poddanych działaniu streptomycyny.

Rysunek 1 przedstawia aktywności I i II układu fotosyntezy wzdłuż liścia kukurydzy oraz wpływu streptomycyny na tę aktywność. Wynika z niego, iż sukcesywnie starsze odcinki liścia wykazują wyższą aktywność obu układów fotosyntezy. Streptomycyna hamuje aktywność I układu fotosyntezy w około 50% we wszystkich badanych odcinkach liścia. Stosunek aktywności I układu fotosyntezy w roślinach kontrolnych do poddanych działaniu streptomycyny utrzymuje się w granicach 2,11-2,67. Hamowanie aktywności I układu fotosyntezy jest, jak się wydaje, niezależne od stopnia rozwoju chloroplastów i zawartego w nich chlorofilu. Porównanie densytogramów (rys. 2) wykazuje, że streptomycyna hamuje również syntezę kompleksu chlorofilowo-białkowego, co potwierdza przypuszczenie Macholda i Auricha [12], iż miejscem jego syntezy jest chloroplast. Aktywność I układu fotosyntezy jest bardzo ściśle uzależniona od występowania tego kompleksu.

Aktywność II układu fotosyntezy hamowana jest przez streptomycynę w znacznie mniejszym stopniu. U podstawy liścia, w odcinku

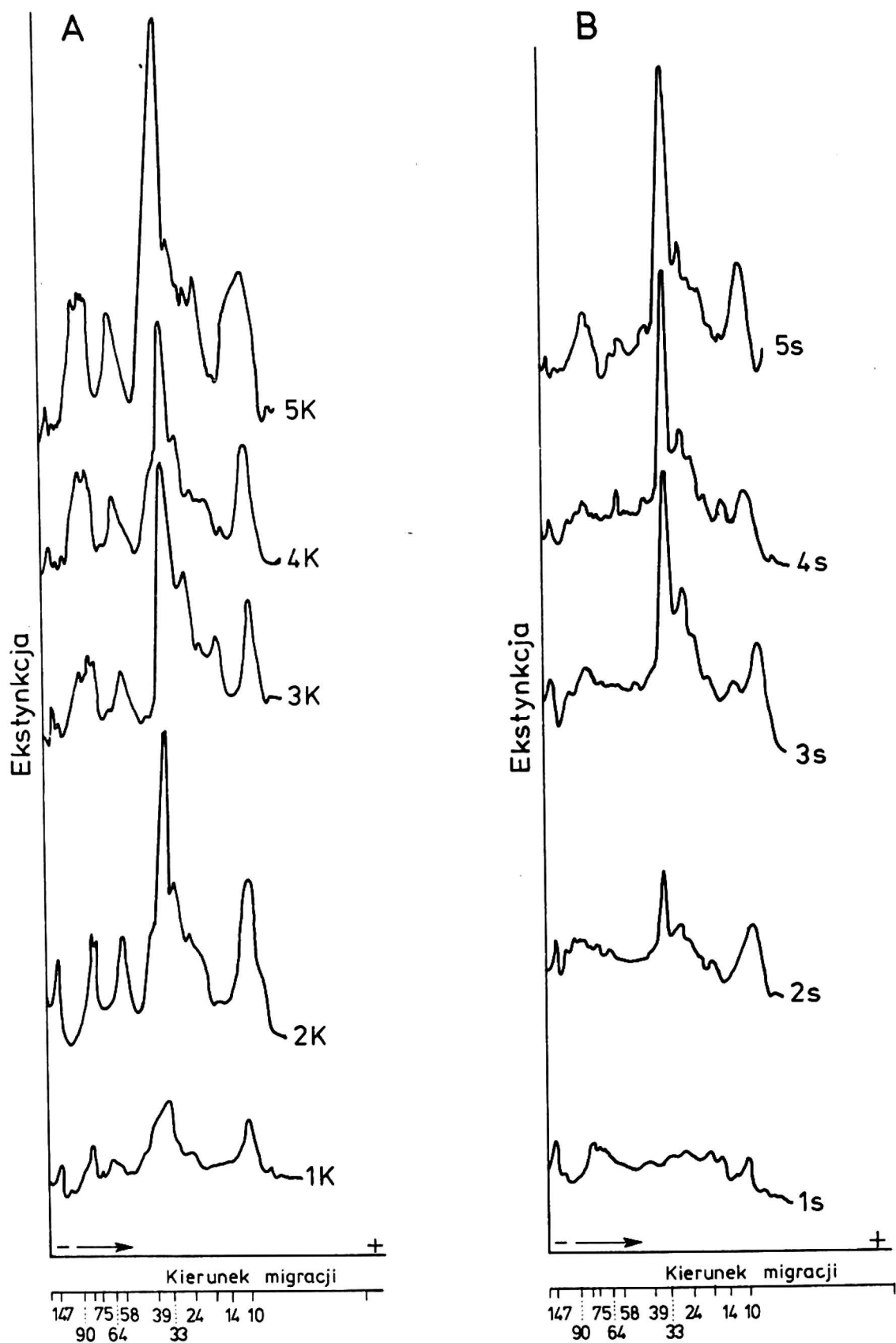


Rys. 1. Wpływ streptomycyny na aktywność I i II układu fotosyntezy w chloroplastach liści kukurydzy; 1 - liście roślin kontrolnych, 2 - liście roślin spryskiwanych roztworem streptomycyny.

Do pomiaru aktywności II układu fotosyntezy użyto, w  $\mu\text{mole}$ ach: bufor Tricine-NaOH (pH 7.0), 150; DCIP, 0.125; zawiesinę chloroplastów odpowiadającą 30  $\mu\text{g}$  chlorofilu w objętości końcowej 3 ml. Do pomiaru aktywności I układu fotosyntezy użyto, w  $\mu\text{mole}$ ach: bufor Tricine-NaOH (pH 8.0), 150; DCMU, 0.03; askorbinian sodu, 50; TMPD 0.2; metyloviologen, 0.4; zawiesinę chloroplastów w ilości odpowiadającej 15  $\mu\text{g}$  chlorofilu w objętości 3 ml; DCIP - 2,6-dwuchlorofenyloindofenol, DCMU - 3,4-dwuchlorofenyl-1,1-dwumetylomocznik, TMPD - N,N,N',N'-czterometylo-p-fenyldwuamina

1. aktywności tej nie udało się oznaczyć mimo obecności w tym odcinku śladowych ilości chlorofilu. Aktywność I układu fotosyntezy osiąga w nim natomiast wartość około 70  $\mu\text{mole}$  pobranego  $\text{O}_2/\text{mg chl}$  godz.

Wcześniejsze ujawnianie się aktywności I układu fotosyntezy przed aktywnością II układu znane jest w procesie zazieleniania siewek różnych gatunków roślin [1]. W dalszych odcinkach liści traktowanych streptomycyną stwierdzono aktywność II układu fotosyntezy a wartość jej wzrasta w kierunku wierzchołka liścia. Wartości te są jednak niższe aniżeli w analogicznych odcinkach roślin kontrolnych. Porównanie aktywności II układu fotosyntezy u roślin kontrolnych i traktowanych streptomycyną wykazują, iż sto-



Rys. 2. Densytogramy lamellarnych białek chloroplastowych wyizolowanych z odcinków liści kukurydzy; kontrolnych (A) oraz spryskiwanych 0,5% roztworem streptomycyny (B)

pień inhibicji maleje idąc w kierunku starszych odcinków liścia, kolejno  $\infty$  2,56, 1,81, 1,73 i 1,43 wykazując wyraźnie tendencję malejącą.

Na zależność aktywności II układu fotosyntezy od rozwoju chloroplastów wskazują densytogramy (rys. 2) lamellarnych białek chloroplastowych w poszczególnych odcinkach liścia zarówno roślin kontrolnych jak i traktowanych streptomycyną. U tych ostatnich, w odcinku 1, brak jest polipeptydów należących do kompleksu chlorofilowo-białkowego II. W odcinku tym nie wykryto również aktywności II układu fotosyntezy. W dalszych odcinkach rośnie aktywność II układu fotosyntezy oraz zwiększa się ilość peptydów kompleksu II. Odnosi się to również do poszczególnych odcinków liścia roślin kontrolnych. Zależność między występowaniem kompleksów chlorofilowo-białkowych a aktywnością I i II układu fotosyntezy obserwowana była już wcześniej [3, 14]. Znane są jednakże przykłady występowania w plastydzie kompleksu chlorofilowo-białkowego II przy zupełnym braku aktywności II układu fotosyntezy [cyt. 19] jak również pojawiania się aktywności tego fotoukładu podczas np. oświetlania światłem błyskowym etiolowanych siewek fasoli, przy całkowitym braku kompleksu II [7].

Tworzenie się fotosyntetycznie kompetentnych błon wymaga komponent syntetyzowanych na rybosomach cytoplazmatycznych i chloroplastowych [19]. Praca niniejsza nie rozstrzyga, czy synteza kompleksu chlorofilowo-białkowego II zachodzi na rybosomach 70S. Według Macholda i Auricha [12] kompleks ten syntetyzowany jest w cytoplazmie, nie zależy zatem od streptomycyny. Dotyczy to także aktywności II układu fotosyntezy. Z badań naszych słuszniejszy wydaje się pogląd Nadlera i in. [13], że rozwój aktywności II układu fotosyntezy jest ograniczony zarówno przez syntezę białek na rybosomach cytoplazmatycznych jak i chloroplastowych. Uzasadnione byłoby zatem przypuszczenie, że na rozwój aktywności fotoukładu II wpływają poza stężeniem chlorofilu i ultrastrukturą plastydów inne jeszcze czynniki.

#### WNIOSKI

1. Streptomycyna hamuje syntezę białek związanych z kompleksem chlorofilowo-białkowym I i znacznie ogranicza aktywność I układu fotosyntezy ( $\text{TMPD} \rightarrow \text{metylowiologen}$ ). Hamowanie tej aktywności jest niezależne od stopnia rozwoju plastydu.

2. Kompleks chlorofilowo-białkowy II jak również aktywność II układu fotosyntezy ( $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DCIP}$ ) hamowane są przez streptomycynę w

невеликим stopniu. Inhibicja II układu fotosyntezy zależy od stopnia rozwoju plastydu.

#### LITERATURA

1. Anderson J.M., Boardman N.K.: *Austr. J. Biol. Sci.*, 17, 93-101, 1964
2. Arnon D.J.: *Plant Physiol.*, 24, 1-15, 1949
3. Bailey J.L., Thornber J.P., Whyborn A.G.: W: *Biochemistry of Chloroplasts Vol.1*. Ed. T.W. Goodwin, Academic Press, London 243, 1966
4. Deken-Grenson M., De: *Biochim. Biophys. Acta*, 17, 35-47, 1955
5. Döbel P.: *Biol. Zbl.*, 82, 275-295, 1963
6. Gillham N.W.: *Ann. Rev. Genetics*, 8, 347-391, 1974
7. Hiller R.G., Pilger D., Genge S.: *Plant Sci Lett.*, 1, 81-88, 1973
8. Kirk J.T.O., Juniper B.E.: *Exp. Cell Res.*, 30, 621-623, 1963
9. Król M.: *Z. Pflanzenphysiol.*, 89, 379-387, 1978
10. Machold O.: *Biochim. Biophys. Acta*, 238, 324-331, 1971
11. Machold O., Stephan U.W.: *Phytochemistry*, 8, 2189-2192, 1969
12. Machold O., Aurich O.: *Biochim. Biophys. Acta*, 281, 103-112, 1971
13. Nadler K., Herron H., Granick S.: *Plant Physiol.*, 49, 388-392, 1972
14. Remy R.: *FEBS Lett.*, 13, 313-317, 1971
15. Robertson D., Leatsch W.M.: *Plant Physiol.*, 54, 148-159, 1974
16. Sane P.V., Goodchild D.J., Park R.B.: *Biochim. Biophys. Acta*, 216, 162-178, 1970
17. Schacterle G.R., Pollack R.L.: *Annal. Biochem.*, 51, 654-655, 1973
18. Signol M.: *Compt. Rend. Acad. Sci Paris*, 27, 1993-1995, 1961
19. Thornber J.P.: *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26, 127-158, 1975
20. Weber K., Osborn M.: *J. Biol. Chem.*, 244, 4406-4412, 1969
21. Zamski E., Umiel N.: *Z. Pflanzenphysiol.*, 88, 317-325, 1978

М. Круль, Т. Башиньски

ВЛИЯНИЕ СТРЕПТОМИЦИНА НА СОСТАВ ЛАМЕЛЛАРНЫХ БЕЛКОВ  
И ФОТОХИМИЧЕСКИЕ АКТИВНОСТИ ХЛОРОПЛАСТОВ ЛИСТЬЕВ КУКУРУЗЫ

#### Р е з ю м е

Исследовалось влияние стрептомицина на активность фотосистем 1 и 11 и на состав ламеллярных белков в хлоропластах кукурузы (*Zea mays* L.) Установлено, что:

1) стрептомицин тормозит синтез белков, связанных с хлорофиллово-белковым комплексом 1 и значительно ограничивает активность,



фотосистемы I (TMPD → метиловиологен). Замедление этой активности зависит от степени развития пластидов.

2) хлорофиллово-белковый комплекс II и активность фотосистемы II ( $H_2O \rightarrow DCIP$ ) тормозятся стрептомицином в незначительной степени. Ингибирование фотосистемы II зависит от степени развития пластидов.

M. Król, T. Baszyński

THE EFFECT OF STREPTOMYCIN ON LAMELLAR PROTEINS PATTERNS  
AND PHOTOCHEMICAL ACTIVITIES IN CHLOROPLASTS OF MAIZE LEAVES

S u m m a r y

Streptomycin inhibits protein synthesis of chlorophyllprotein complex I and Photosystem I activity measured as photoreduction of methyl viologen by DCIP-ascorbate. Inhibition of Photosystem I activity is not correlated with stage of plastid development. Chlorophyll-protein complex II as well as Photosystem II activity are inhibited by streptomycin in small extent. Inhibition of Photosystem II seems to be related to stage of plastid development.