

Член-корреспондент АН СССР А. А. ШЛЫК, И. В. ПРУДНИКОВА,
А. В. МАЛАШЕВИЧ

СПОСОБНОСТЬ ГОМОГЕНАТА ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ К ТЕМНОВОМУ ПРЕВРАЩЕНИЮ ВВЕДЕННОГО ИЗВНЕ ХЛОРОФИЛЛА а В ХЛОРОФИЛЛ b

Накоплен значительный материал, свидетельствующий о последовательном образовании хлорофилла b из хлорофилла а (¹⁻³). Работами недавнего времени показан синтез хлорофилла b в этиолированном растении уже в самом начале его освещения (⁴⁻⁸), а также при повторном затемнении после возникновения первых молекул хлорофилла а (⁴⁻⁶). Установлено также, что и фрагменты хлоропластов выполняют темновую реакцию образования хлорофилла b (⁹), причем не только из эндогенного хлорофилла а собственной ткани, но и из введенного извне (¹⁰). Наши данные об этом были недавно специально проверены и подтверждены (¹¹). В гомогенате кратковременно освещенных этиолированных проростков зарегистрировано заметное увеличение фонда хлорофилла b после инкубации в темноте (¹²).

Настоящая работа является следующим этапом в реализации системы *in vitro* способной к превращению хлорофилла а в хлорофилл b. Предпринята попытка вызвать образование хлорофилла b при введении экзогенного хлорофилла а в гомогенат этиолированных проростков, никогда не видевших света.

12-дневные этиолированные проростки кукурузы линии Черновицкая-21, выращенные при 23—26°, растирали по 150 штук в минимальном объеме $\frac{1}{15}$ M фосфатного буфера (рН 7,2) при 3—4° до получения однородной массы. Используемый в опытах хлорофилл а выделяли из зеленых листьев и очищали 5-кратным хроматографированием на бумаге. В очищенном препарате не обнаруживалось следов хлорофилла b ни непосредственно по спектрам поглощения и флуоресценции, ни по разностному спектру флуоресценции при возбуждении 460 и 430 мμ (см. ниже). По методу Коста (¹³), смесь 2 мл ацетонового раствора хлорофилла а и 8 мл 0,2% раствора твина-80 в том же буфере приливали к гомогенату, который затем суспендировали в 40 мл 60% раствора сахарозы. Количество вводимого хлорофилла а соответствовало тому, которое образовалось бы в этиолированных проростках из протохлорофиллида после 1 мин. освещения (обычно 200 мг). В одну из проб добавляли 2 мг НАДФ⁺, который, по данным Элсворса и других (¹⁴), стимулирует процесс превращения хлорофилла а в хлорофилл b. Пробы инкубировали в термостате при 30° в течение 6 час., а затем фиксировали 4-кратным объемом ацетона. Все операции по выращиванию и обработке этиолированного материала, включая фиксацию, проводили в полной темноте без какого-либо использования даже слабого зеленого света. Фитолизированные пигменты переводили из ацетонового раствора в петролейный эфир и хроматографировали на бумаге (петролейный эфир: ацетон 85:15). Предшествующие работы показали (^{5, 6}), что при этом удаляется значительная часть каротиноидов, а флуоресценция позволяет выявить полосу, состоящую в основном из хлорофилла а, и еще одну, менее подвижную, в которой могут присутствовать протохлорофилл, хлорофилл а и хлорофилл b. Последнюю полосу экстрагировали ацетоном, из кото-

рого пигменты переводили в этиловый эфир для анализа на высокочувствительной спектрофлуориметрической установке. Использовали возбуждение в области максимума поглощения хлорофилла *b* (460 м μ) и, отдельно, — хлорофилла *a* (430 м μ). Вычитание из спектра флуоресценции при возбуждении 460 м μ спектра того же раствора при возбуждении 430 м μ (после нормирования по максимуму хлорофилла *a* или протохлорофилла) позволяло отчетливо наблюдать в разностном спектре максимум флуоресценции хлорофилла *b*. При равных количествах введенного хлорофилла *a* относительные высоты разностных спектров позволяют судить о количестве хлорофилла *b*. Нужная для численных оценок калибровочная кривая зависимости отношения интенсивностей в максимумах флуоресценции хлорофилла *b* и хлорофилла *a* от соотношения концентраций была построена по смесям чистых пигментов. До сравнения с калибровочной кривой из результатов измерений вычитали вклад флуоресценции протохлорофилла при длинах волн максимумов хлорофиллов *b* и *a*.

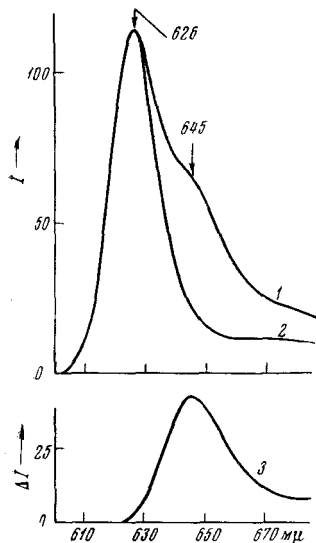


Рис. 1. Спектры флуоресценции эфирных растворов пигментов из этиолированных проростков (элюат менее подвижной полосы на хроматограмме). При возбуждении светом 460 м μ (1), при возбуждении светом 433 м μ (2), разностный спектр (3)

Спектр флуоресценции этиолированных проростков кукурузы обнаруживает присутствие в них очень небольшого количества хлорофилла *a* (¹⁴). Следовало проверить, нет ли в гомогенате и хлорофилла *b*. На рис. 1 сопоставлены спектры флуоресценции пигментов этиолированных листьев, полученные при возбуждении светом 460 и 433 м μ . Они нормированы по максимуму свечения протохлорофилла и обнаруживают весьма существенное различие, обусловленное присутствием хлорофилла *b*. Об этом отчетливо говорит разностный спектр. Заметим, что разностный спектр оказался одинаков у гомогенатов незафиксированных и фиксированных паром проростков как до, так и после инкубации. Таким образом, в дальнейшей работе приходилось учитывать присутствие некоторого количества хлорофилла *b* в самом этиолированном материале.

При расчете разностных спектров, сопоставленных на рис. 2, использовали иной тип нормирования: перед вычитанием спектра, зарегистрированного при возбуждении светом 430 м μ , из спектра при возбуждении светом 460 м μ их нормировали по максимуму хлорофилла *a*. В этом случае разностный спектр отражает присутствие и хлорофилла *b*, и протохлорофилла. Кривая 1 показывает, что экзогенный хлорофилл *a* был очищен от опасных примесей. Плечо на кривой 2 обнаруживает присутствие хлорофилла *b* в этиолированных растениях и при таком способе нормирования. Высота максимума флуоресценции протохлорофилла на кривых 2, 3 и 4 одинакова. Это означает, что она не зависела от инкубации и могла служить как бы дополнительным внутренним стандартом для сопоставления интенсивности свечения хлорофилла *b* в разных вариантах опыта. Появление на кривых 3 и 4 максимумов флуоресценции хлорофилла *b* показывает, что инкубация гомогената с экзогенным хлорофиллом *a* ведет к значительному увеличению количества хлорофилла *b*, которое еще более заметно при добавлении НАДФ⁺.

Рассмотренные разностные спектры, соответствующие изменению длины волны возбуждающего света, могут быть условно обозначены символом $J_{460} - J_{430}$. По данным серии опытов получили их усреднен-

ные значения для каждого варианта инкубации. Отдельно нашли усредненный разностный спектр для препаратов из этиолированных листьев без добавления хлорофилла а. На этой основе рассчитали разностный спектр второго порядка $(J_{460} - J_{430})_{t_1} - (J_{460} - J_{430})_{t_0}$, обусловленный самой инкубацией. Полученные кривые представлены на рис. 3. Отчетливый максимум флуоресценции хлорофилла b еще раз подтверждает, что инкубация действительно приводит к его накоплению и что присутствие НАДФ⁺ стимулирует этот процесс.

Оценка количества образовавшегося хлорофилла b привела к следующим результатам.

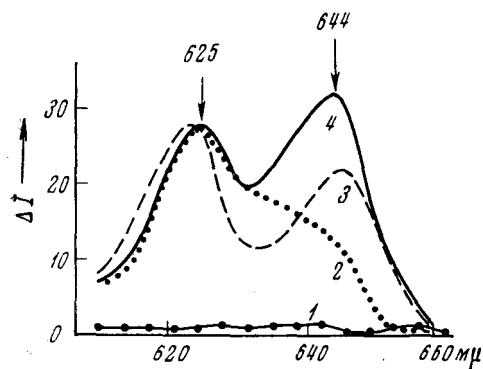


Рис. 2

Рис. 2. Разностные спектры флуоресценции эфирных растворов пигментов из гомогенатов этиолированных проростков кукурузы (элюат менее подвижной полосы на хроматограмме). Экзогенный хлорофилл а (1), гомогенат с экзогенным хлорофиллом а до инкубации (2), после инкубации (3), с экзогенным хлорофиллом а и НАДФ⁺ после инкубации (4)

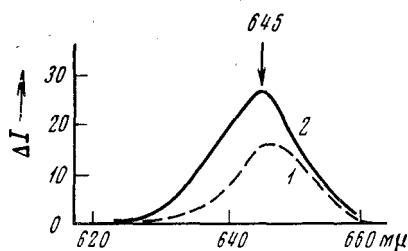


Рис. 3

Рис. 3. Превышение разностных спектров флуоресценции эфирных растворов пигментов из гомогенатов после инкубации с введенным экзогенным хлорофиллом а над разностным спектром пигментов из гомогенатов этиолированных проростков. 1 — гомогенат с экзогенным хлорофиллом а после инкубации минус гомогенат этиолированного листа; 2 — гомогенат с экзогенным хлорофиллом а и НАДФ⁺ после инкубации минус гомогенат этиолированного листа

В элюате из подвергавшейся анализу нижней полосы хроматограммы пигментов этиолированных проростков было найдено $2,4 \pm 0,1\%$ хлорофилла b по отношению к хлорофиллу а. За 6 час. инкубации с экзогенным хлорофиллом а эта величина возросла до $3,1 \pm 0,1\%$, а в присутствии также и НАДФ⁺ — до $4,1 \pm 0,1\%$, т. е. в 1,7 раза. Статистическая вероятность случайного происхождения различий между любыми парами этих величин по критерию Стьюдента весьма мала ($P < 0,01$). Поскольку во всех вариантах хроматографирование велось одинаково, что создавало условия для неизменного распределения хлорофилла а между более и менее подвижными полосами, можно заключить, что эти соотношения справедливы и для всей суммы пигментов растения. Абсолютные же соотношения хлорофиллов b и а в растении с учетом хлорофилла а, отделявшегося при хроматографировании в виде отдельной полосы, оцениваются величинами, по крайней мере вдвое меньшими, чем приведенные выше.

Обнаружение отсутствия задержки появления хлорофилла b в самом начале освещения этиолированных проростков (⁵, ⁶), способствовало развитию концепции о локализации процесса хлорофиллообразования в особых центрах биосинтеза (¹⁵), свидетельствуя о том, что соответствующая ферментная система готова к работе, как только появится необходимый субстрат — хлорофилл а (⁵, ⁶). Оставалось, однако, неясным, предсуществует ли аппарат, превращающий хлорофилл а в хлорофилл b, в активном состоянии еще до освещения или он приобретает активность только в момент освещения, необходимого для фотовосстановления протохлорофиллида. Результаты настоящей работы однозначно свидетель-

ствуют о том, что уже в этиолированном листе имеется и (по крайней мере, частично) активен набор ферментов и элементов структуры, необходимых для образования хлорофилла b из хлорофилла a, откуда бы последний ни появился. Сказанное не исключает, конечно, что этот аппарат может приобрести еще большую активность после освещения.

Лаборатория биофизики и изотопов
Академии наук БССР
Белорусский государственный университет
им. В. И. Ленина
Минск

Поступило
20 VII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. A. Shlyk, V. L. Kaler et al., *Photochem. Photobiol.*, **2**, 129 (1963).
² А. А. Шлык, *Метаболизм хлорофилла в зеленом растении*, Минск, 1965. ³ A. A. Shlyk, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **22**, 169 (1971). ⁴ Л. И. Фрадкий, А. А. Шлык, В. М. Коляго, *ДАН*, **171**, 222 (1966). ⁵ А. Б. Рудой, А. А. Шлык, А. Ю. Везицкий, *ДАН*, **183**, 215 (1968). ⁶ A. A. Shlyk, A. B. Rudoi, A. Yu. Vezitskii, *Photosynthetica*, **4**, 63 (1970). ⁷ Э. И. Зенкевич, А. П. Лосев, *Журн. прикл. спектроскопии*, **13**, 6 1032 (1970). ⁸ S. W. Thorne, N. K. Boardman, *Plant Physiol.*, **47**, 2, 252 (1971). ⁹ А. А. Шлык, И. В. Прудникова, *ДАН*, **160**, 720 (1965). ¹⁰ A. A. Shlyk, I. V. Prudnikova, *Photosynthetica*, **1**, 157 (1967). ¹¹ R. K. Ellsworth, H. I. Perkins et al., *Biochim. et biophys. acta*, **223**, 275 (1970). ¹² А. А. Шлык, И. В. Прудникова и др., *ДАН*, **200**, № 1 (1971). ¹³ C. Costes, *C. R.*, **256**, 3535 (1963). ¹⁴ Ф. Ланг, Л. М. Воробьева, А. А. Красновский, *Мол. бол.*, **5**, 366 (1971). ¹⁵ A. A. Shlyk, I. V. Prudnikova et al., In: *Progress in Photosynthesis Research*, Tübingen, **2**, 572 (1969).