

И. И. БОГАЧЕВА, Т. Е. КИСЛЯКОВА, Б. М. ГОЛУБКОВА, И. М. ШЛЫКОВА

ФОТОФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ХЛОРОПЛАСТОВ СЕЛАГИНЕЛЛЫ

(*SELAGINELLA KRAUSSIANA, SELAGINELLA GLAUCA*)

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 26 VII 1971)

Изучение фотосинтетического аппарата растений селлагинеллы в связи с его примитивностью интересно с эволюционной точки зрения. В клетках листа *Selaginella kraussiana* хлоропласты имеют ламеллярный тип строения, показана корреляция между примитивностью структуры и низкой активностью фотосинтетического аппарата этих растений (¹). По нашим представлениям, для этого этапа эволюции фотосинтетического аппарата характера относительно низкая интенсивность фотофосфорилирующих (ф.ф.) и электронтранспортных (э.т.) реакций с достаточной степенью сопряжения. Это явилось прогрессивным эволюционным признаком по сравнению с хлоропластами водорослей, где довольно активный транспорт электронов слабо сопряжен с фосфорилированием (^{2, 3}). В хлоропластах высокоорганизованных растений большая скорость э.т. и ф.ф. реакций сочетается с высокой степенью их сопряжения (^{4, 5}).

Исходя из этого, целью нашей работы было установление различий в ф.ф. активности, связь с э.т. реакциями у хлоропластов селлагинеллы и сравнение этой связи с хлоропластами более высокоорганизованных высших растений (горох). Такие сравнения пытались сделать с синезеленой водорослью *Anabaena* или с *Euglena* (^{6, 7}). Помимо расчета активности фотофосфорилирования на 1 мл хлорофилла, мы решили провести сравнение ф.ф. хлоропластов селлагинеллы и гороха на один хлоропласт.

Растения гороха (сорт «Победитель») и селлагинеллы выращивали в условиях теплицы при естественном освещении. Хлоропласты извлекали в среду выделения, содержащую 0,35 *M* NaCl, трис-HCl 0,02 *M* pH 8,0 (^{8, 9}) или 0,4 *M* сахарозу, 0,05 *M* трис-HCl pH 8,0 0,01 *M* NaCl (^{5, 6, 10-12}). Кроме этого, для стабилизации структуры хлоропластов в процессе извлечения добавляли аскорбат (0,01 *M*), восстановленный глутатион (0,0005 *M*) и сывороточный альбумин (СА) как в среду выделения (5—20 мг/мл), так и в реакционную смесь (1,5—1,7 мг/мл (^{4, 5, 10, 11, 13})). Основываясь на данных предварительных опытов, при выделении хлоропластов гороха, а также хлоропластов селлагинеллы в солевой среде СА в реакционную среду не прибавляли. Хлоропласты выделяли методом дифференциального центрифугирования при 0—2° с последующим микроскопическим контролем фракции хлоропластов. Фотофосфорилирование определяли по убыли неорганического фосфата методом Фiske — Суббароу с разными акцепторами электронов: феназинметасульфатом (ФМС), феррицианидом (ФЦ) и флавиномононуклеотидом (ФМН). Реакционная смесь и условия опыта указаны в подписях к таблицам и рисункам. Реакцию прекращали добавлением равного объема 5% ТХУ в опытные и контрольные (темновые) пробы. Для расчета активности ф.ф. на 1 мг хлорофилла концентрацию хлорофилла определяли в ацетоновой вытяжке на спектрофотометре СФ-4. Для расчета активности ф.ф. на один хлоропласт подсчитывали количество хлоропластов в объеме суспензии, добавляемой в реакционную среду, с помощью камеры Горяева. В опытах по определению ф.ф. хлоропластов, сопряженного с восстановлением феррицианида, восстановление ФЦ и поглощение

фосфора определяли в одной пробе по методике, описываемой Чернавиной и Кукарских (¹⁴). Выделение хлоропластов в этих опытах проводили только с добавлением СА (5—10 мг/мл) без глутатиона и аскорбата.

Микроскопический контроль фракции хлоропластов показал (световой микроскоп), что в сахарозной среде выделения можно получить до 80% целых хлоропластов, тогда как в солевой среде с добавлением СА количество целых хлоропластов достигало только 50%. В соответствии с этим подсчет хлоропластов проводился только при выделении их в сахарозной среде.

Т а б л и ц а 1

Влияние альбумина на скорость фотофосфорилирования хлоропластами селлагинеллы

Объект	Среда выделения	Концентр. альбумина, мг на 1 мл среды выделения	Концентр. хлорофилла, μ г	Активность фотофосфорилирования в μ мол. на 1 мг хлорофилла в час		
				нециклич. с $K_3Fe(CN)_6$	циклич. с ФМС	циклич. с ФМН
S. glauca	Трис-NaCl	10	66	12,4 $\pm$ 2,8	12,8 $\pm$ 1,4	31,7 $\pm$ 1,3
	Трис-NaCl	20	60	13,3 $\pm$ 1,7	50,0 $\pm$ 2,3	
S. kraussiana	Трис-NaCl	10	50	24,8 $\pm$ 4,1	26,9 $\pm$ 3,7	
S. kraussiana	Сахароза — трис-NaCl	5	45	49,5 $\pm$ 1,2	74,8 $\pm$ 1,4	—

Т а б л и ц а 2

Активность нециклического фотофосфорилирования, сопряженного с восстановлением феррицианида, у хлоропластов селлагинеллы

Объект	Среда выделения	Концентр. альбумина, мг на 1 мл среды выделения	Колич. хлорофилла в пробе, μ г	Ф. ф., μ мол. $P_{неорг}$ на 1 мг хлорофилла в час	Восстановление феррицианида, μ мол. на 1 мг хлорофилла в час	Отношение $P/2e$
S. glauca	Трис-NaCl	10	130	20,7 $\pm$ 0	58,5 $\pm$ 2,50	0,74
S. kraussiana	Трис-NaCl	10	107	17,4 $\pm$ 1,9	42,6 $\pm$ 2,16	0,82
S. kraussiana	Сахароза — трис-NaCl	5	44	49,5 $\pm$ 1,2	96,5 $\pm$ 1,8	0,97

Реакционная смесь содержала (в μ мол.): трис-HCl (pH 8,0) 45; $MgCl_2$ 8; K_2HPO_4 10; АДФ 4; $K_3Fe(CN)_6$ 1,8 или ФМС 0,05; аскорбат (в варианте с ФМС) 5 и хлоропласты, содержащие от 45—66 μ г хлорофилла. При использовании среды выделения с сахарозой добавляли 1,7 мг/мл альбумина. Объем реакционной смеси 1,5 мл. Интенсивность света 25 000 лк, экспозиция 6 мин., 18—20°.

Фотофосфорилирующая активность хлоропластов селлагинеллы, выделенных в солевой среде даже с добавлением альбумина (10 мг/мл), невелика (табл. 1). Увеличение концентрации СА до 20 мг/мл не влияет на активность нециклического ф.ф. и примерно в 4 раза стимулирует активность циклического ф.ф. с ФМС. В этих же условиях обнаружена заметная активность псевдоциклического ф.ф. (31,7 μ мол. $P_{неорг}$). В случае использования сахарозной среды выделения (сахароза — трис-NaCl) и добавлении СА как в среду выделения, так и в реакционную смесь хлоропласты селлагинеллы имеют более высокую активность нециклического и циклического ф.ф., чем хлоропласты, выделенные в солевой среде (табл. 1).

Низкая фотофосфорилирующая активность хлоропластов селлагинеллы может быть обусловлена либо слабой степенью сопряжения фосфорилирования с довольно активным транспортом электронов, как это отмечено у водорослей хламидомонас (²), хименомонас (³), либо слабой активностью

электронтранспортных и фотофосфорилирующих реакций с достаточной степенью сопряжения.

Реакционная смесь (общий объем 3 мл) в $\mu\text{мол.}$: трис- HCl (pH 8,0) 100; NaCl 70; MgCl_2 10; $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1,8, K_2HPO_4 10, АДФ 3, суспензия хлоропластов с содержанием хлорофилла 0,044—0,130 мг. При использовании среды выделения с сахарозой добавляли 1,7 мг/мл альбумина. Интенсивность света около 25 000 лк, $18-20^\circ$, экспозиция 4 мин. Наши опыты по параллельному определению ф.ф. и восстановления ФЦ у хлоропластов селлагинеллы показали (табл. 2), что при небольшой скорости восстановления ФЦ степень сопряжения, вычисленная по отношению $\text{P}/2\text{e}$, достаточна, ибо она равна 0,74—0,82, а с добавлением СА в реакционную среду 0,97, т. е. величины, близкие тем, которые отмечены для хлоропластов фасоли и ячменя (^{4, 5}).

Следовательно, относительно низкая ф.ф. активность хлоропластов селлагинеллы объясняется скоростью электронтранспортных реакций, поскольку стимулирование этих реакций СА или торможение хлорамфениколом у хлоропластов ячменя (^{4, 13}) приводит к соответствующему изменению активности ф.ф. Наличие сопряжения фосфорилирования и транспорта электронов в хлоропластах селлагинеллы даже при низкой активности этих процессов явилось прогрессивным эволюционным признаком.

Анализируя результаты опытов, приведенные на рис. 1, можно видеть, что при одинаковой концентрации хлорофилла в реакционной среде скорости светового образования АТФ хлоропластами селлагинеллы гораздо ниже, чем у хлоропластов гороха. Скорость нециклического ф.ф. с ФЦ составляет у хлоропластов селлагинеллы (*Selaginella kraussiana*) 90 $\mu\text{мол.}$ $\text{P}_{\text{неорг}}$ на 1 мг хлорофилла в час, скорость циклического ф.ф. 135 $\mu\text{мол.}$, у хлоропластов гороха 475 и 684 $\mu\text{мол.}$ соответственно. Слабая активность фотофосфорилирования у хлоропластов селлагинеллы не связана с увеличением активности АТФазы хлоропластов, которая, как нами ранее показано (¹), характеризуется небольшими величинами.

Можно отметить специфику фотофосфорилирующих реакций у селлагинеллы: соотношение нециклического и циклического ф.ф. складывается в пользу нециклического. Мы наблюдали относительно низкие величины циклического ф.ф. по сравнению с активностями, отмеченными в литературе для хлоропластов более высокоорганизованных растений (^{7, 11}). Такое же уменьшение относительной доли циклического ф.ф. по отношению к нециклическому наблюдается у хлоропластов эвглены (⁷) и хламидомонасы (¹⁵) сравнительно с хлоропластами ячменя и фасоли (^{4, 5}). Это подтверждает мнение некоторых исследователей (^{16, 17}), что циклическое ф.ф. — более позднего происхождения и возникло как ветвь нециклического ф.ф. Циклический ток электронов требует большей структурированности и компактности грани (¹⁷), что согласуется с вышеприведенными данными (рис. 1) об уровне циклического фотофосфорилирования у хлоропластов селлагинеллы, а также с данными о большем влиянии доба-

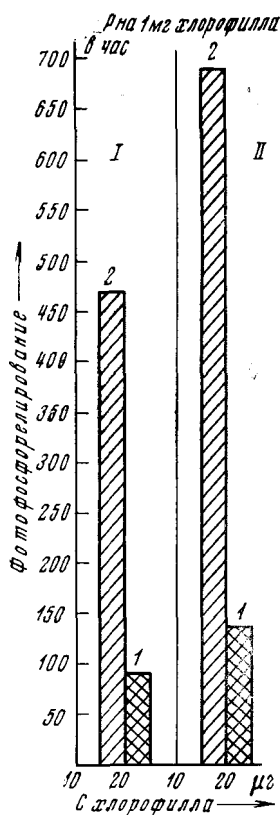


Рис. 1. Скорость фотофосфорилирования хлоропластов селлагинеллы (1) и гороха (2). I — с ФЦ, II — с ФМС. Реакционная смесь в $\mu\text{мол.}$ (в объеме 1,5 мл): трис- HCl (pH 8,0) 45; MgCl_2 8; АДФ 4; K_2HPO_4 10; $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1,8 или ФМС 0,05; аскорбат (в варианте с ФМС) 5 и хлоропласты, содержащие около 20 $\mu\text{г}$ хлорофилла. Интенсивность света 45 000 лк, $18-20^\circ$, экспозиция 4 мин.

Интенсивность фотофосфорилирования хлоропластов селлагинеллы (*S. kraussiana*) и гороха (*Pisum sativum*), сорт «Победитель»

Объект	Колич. хлорофилла в пробе, $\mu\text{г}$	Число хлоропластов в пробе	Колич. хлорофилла на 1 хлоропласт в $\mu\text{г}$	Фотофосфорилирование в $\mu\text{мол. Рнеорг}$ на один хлоропласт в час	
				нециклич. с $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	циклич. с ФМС
<i>S. kraussiana</i>	20	$0,76 \cdot 10^7$	$26,4 \cdot 10^{-7}$	$2,5 \cdot 10^{-7}$	$3,55 \cdot 10^{-7}$
<i>P. sativum</i>	17,1	$1,65 \cdot 10^7$	$10,3 \cdot 10^{-7}$	$4,8 \cdot 10^{-7}$	$7,05 \cdot 10^{-7}$
<i>P. sativum</i>	35,5	$3,44 \cdot 10^7$	$10,3 \cdot 10^{-7}$	$4,8 \cdot 10^{-7}$	$7,8 \cdot 10^{-7}$

вок СА на активность циклического ф.ф. по сравнению с нециклическим (табл. 1). Таким образом, при создании условий, необходимых для максимальных скоростей ф.ф. (¹¹) у хлоропластов селлагинеллы, мы не получили таких же высоких значений ф.ф. (при расчете на 1 мг хлорофилла в час), какие наблюдали у хлоропластов гороха. Эту разницу можно объяснить относительной примитивностью структуры фотосинтетического аппарата селлагинеллы в связи с систематическим положением этих растений. Сопоставление скоростей ф.ф., приводимых в литературе у водорослей и высших растений (^{2-7, 11-15}), подтверждает это предположение.

Относительная примитивность структуры фотосинтетического аппарата селлагинеллы по сравнению с хлоропластами гороха — причина низкой активности электронтранспортных и ф.ф. реакций. Это предположение находит подтверждение в наших опытах по определению скорости ф.ф. при расчете на один хлоропласт (табл. 3).

Реакционная смесь (в $\mu\text{мол.}$): трис- HCl (рН 8,0) 45; MgCl_2 8; K_2HPO_4 10; АДФ 4; $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1,8 или ФМС 0,05; аскорбат (в варианте с ФМС) 5 и хлоропласты, содержащие 20—35,5 $\mu\text{г}$ хлорофилла. Объем реакционной смеси 1,5 мл. Интенсивность света 45 000 лк, 18—20°, экспозиция 4 мин.

Несмотря на то что хлоропласты селлагинеллы содержат в 2,5 раза больше хлорофилла, так как они больше по величине, активность ф.ф. таких хлоропластов в 2 раза меньше, чем у хлоропластов гороха. Следовательно, структурные особенности фотосинтетического аппарата селлагинеллы (ламеллярный тип строения и отсутствие типичных гран) определяет низкий уровень ф.ф. реакций.

Авторы выражают благодарность В. М. Каревой за предоставление различных видов селлагинелл, проф. А. А. Шахову — за ценные указания при написании статьи.

Институт физиологии растений
им. К. А. Тимирязева
Академии наук СССР
Москва

Поступило
26 VII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Б. М. Голубкова, Т. Е. Кислякова и др., В сборн. Хлоропласты и митохондрии, «Наука», 1969, стр. 74. ² D. S. Gorman, R. P. Levine, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 54, 6, 1665 (1965). ³ S. W. Jeffrey, J. Ulbrich, M. B. Allen, Biochim. et biophys. acta, 112, 1, 35 (1965). ⁴ M. Friedlander, J. Neumann, Plant Physiol., 43, 10, 1249 (1968). ⁵ C. D. Howes, A. J. Stern, Plant Physiol., 44, 11, 1911 (1969). ⁶ W. C. Duane, M. C. Hohl, D. W. Krogmann, Biochim. et biophys. acta, 109, 1, 108 (1965). ⁷ J. C. Kahn, ibid., 153, 1, 203 (1968). ⁸ Д. Арнон, Хлоропласты и фотосинтез. В сборн. Структура и функция фотосинтетического аппарата, М., 1962. ⁹ Р. М. Бекина, Н. М. Сисакян, ДАН, 152, № 2, 467 (1963). ¹⁰ A. M. Jagendorf, M. Avron, J. Biol. Chem., 231, 1, 277 (1958). ¹¹ M. Avron, Biochim. et biophys. acta, 40, 2, 257 (1966). ¹² B. Mifflin, R. H. Nageman, Plant Physiol., 38, 1, 166 (1963). ¹³ М. К. Николаева, Изменение фотосинтетического аппарата при ингибировании синтеза белка, Автореф. кандидатской диссертации, 1969. ¹⁴ И. А. Чернавина, Г. А. Кукарских, ДАН, 176, № 4, 959 (1967). ¹⁵ B. Moll, R. P. Levine, Plant Physiol., 46, 4, 576 (1970). ¹⁶ L. N. M. Duysens, Progress in Biophys. and Molec. Biol., 14, 1 (1964). ¹⁷ E. Broda, Progress in Biophys. and Molec. Biol., 21 (1970).