

УДК 541.144.7+581(132+174)

БИОФИЗИКА

А. Б. РУДОЙ, А. Ю. ВЕЗИЦКИЙ, член-корреспондент АН СССР А. А. ШЛЫК

ТЕМНОВЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ ПИГМЕНТОВ ПОСТЭТИОЛИРОВАННЫХ ЛИСТЬЕВ ПОСЛЕ РАЗЛИЧНЫХ ПЕРИОДОВ ОСВЕЩЕНИЯ

Ранее мы показали, что хлорофилл *b* появляется в этиолированных проростках сразу же с началом освещения без какой-либо задержки (^{1,2}). О раннем обнаружении пигмента сообщили позднее и другие исследователи (^{3,4}). Дальнейшее накопление хлорофилла *b* может происходить в полной темноте (хотя в работе (⁴) этого не наблюдалось), достигая некоторого максимального значения, после чего концентрация пигмента снижается до более низкого, длительно сохраняющегося уровня (^{1,2}). Эта особенность интерпретировалась как свидетельство образования хлорофилла *b* по крайней мере в двух различающихся по своей стабильности состояниях. Анализ начальных участков кривых накопления хлорофиллов *a* и *b* и сравнение кинетики темновых превращений как этих пигментов, так и хлорофиллида привели нас к выводу о происхождении хлорофилла *b* из хлорофилла *a* и на самой ранней стадии зеленения (²). С другой стороны, хлорофилл *a* также достигает в темноте неизменного уровня и, следовательно, не весь фонд его молекул в равной степени способен превращаться в хлорофилл *b*. Таким образом, метаболическая неоднородность пигментных фондов хлорофиллов *a* и *b*, обнаруженная вначале в зеленых листьях (⁵), выявляется уже при возникновении первых следов хлорофиллов.

В настоящей работе было специально исследовано, в какой мере степень завершенности формирования фотосинтетического аппарата, развивающегося в процессе зеленения этиолированного листа, сказывается на темновом метаболизме пигментов.

12-дневные проростки кукурузы, выращенной в полной темноте при температуре 24—25°, освещали с разной продолжительностью (1, 45, 90 мин., 4, 6 или 12 час.) флуоресцентными лампами ЛБ-40 (интенсивность 1500 лк, или 7500 эрг/см² · сек) и вновь возвращали в темноту. В каждом из вариантов первую пробу фиксировали до начала освещения, вторую — в конце светового периода и последующие — в течение повторного затемнения. Содержание пигментов рассчитывали на 1 г сырого веса листовых пластинок, но в течение опыта и сырой, и сухой вес одного листа оставались постоянными. Фиксация, отбор и взвешивание растений, экстракция и разделение фитольных и бесфитольных пигментов, определение содержания хлорофилла *a*, хлорофиллида и протохлорофиллида в пробе описаны ранее (^{1,2}). Но определение соотношения между хлорофиллами *b* и *a* (X_{lb}/X_{la}) производили в данной работе по спектрам флуоресценции серноэфирных растворов, возбуждаемой ксеноновой лампой ДКСШ-1000 через интерференционный светофильтр в области 460 мμ. Метод, все шире применяемый в последнее время (^{3,4}), основан на отсутствии резонансного переноса энергии фотовозбуждения от хлорофилла *b* к хлорофиллу *a* при концентрациях пигментов порядка 10⁻⁶ мол/л и ниже. Для практического пользования построили периодически проверяемую градуировочную кривую изменения отношения интенсивностей в максимумах флуоресценции хлорофиллов *b* и *a* (I_b/I_a) в смесях хроматографически

очищенных пигментов, бравшихся в соотношении (X_{lb}/X_{la}) от 0 до 1,2.

Порядок работы был следующим. Петролейноэфирный раствор фитолизированных пигментов упаривали до меньшего объема и хроматографировали полосой в смеси петролейный эфир — ацетон (93:7). Хлорофиллы а и b не разделялись, но удалялась большая часть желтых пигментов, присутствие которых влияет при наших условиях измерения на получаемое отношение X_{lb}/X_{la} . Контролируя по флуоресценции, полюсу хлорофиллов вырезали, пигменты элюировали ацетоном и переводили в серный эфир. Для лучшего отделения остаточной воды растворы выдерживали в холодильнике несколько часов. Концентрацию пигментов доводили по оптической плотности в максимуме хлорофилла а до величины 0,15.

В постэтиолированных листьях, особенно в начале зеленения, всегда присутствует протехлорофилл. Поскольку этот пигмент не отделяли от хлорофиллов а и b, следовало учесть вклад его флуоресценции. В наших условиях интенсивность флуоресценции хроматографически чистого протехлорофилла, приходящаяся на область максимумов хлорофилла b и хлорофилла а, составляла соответственно 0,16 и 0,13 от величины интенсивности его максимума. В то же время на величине последнего флуоресценция хлорофиллов а и b практически не сказывается. Вычитая таким образом вклад флуоресценции протехлорофилла, находили значения I_b/I_a , обусловленные собственно хлорофиллами b и а,

которые и использовали для сравнения с градуировочной кривой. Проведенные опыты показали, что применяемая методика не приводит к избирательной потере только хлорофилл а и b. Содержание протехлорофилла в пробе определяли в тех же растворах по спектрам флуоресценции, возбуж-

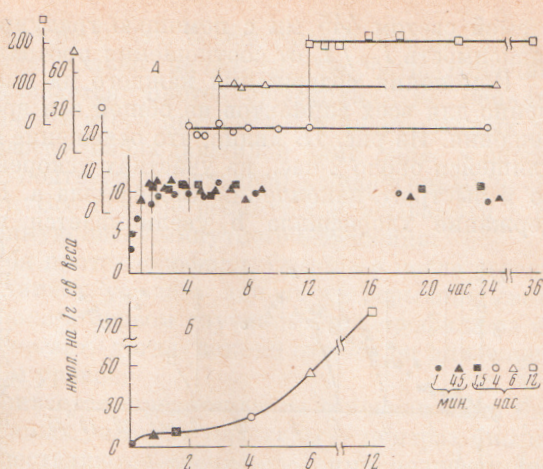


Рис. 1. Изменения количества хлорофилла а (в наномолях на 1 г свежего веса) в темноте в этиолированных проростках кукурузы, предварительно освещавшихся разное время (А), и уровня накопления хлорофилла а в конце соответствующих световых периодов (В). Внизу справа приведен тип символов, принятых для каждого из вариантов опытов. Цифры под символами указывают длительность предварительного освещения. Вертикальными линиями обозначены моменты прекращения освещения

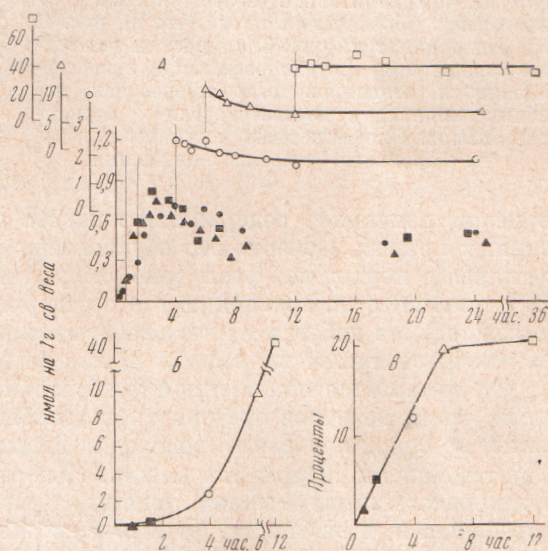


Рис. 2. Изменения количества хлорофилла b в темноте в этиолированных проростках кукурузы, предварительно освещавшихся разное время (А), уровня накопления хлорофилла b (В) и его отношения к хлорофиллу а (В) в конце соответствующих световых периодов. Обозначения те же, что на рис. 1

даемой светом 445 мμ с помощью градуировочной кривой, описывающей зависимость $I_{пр}/I_a$ от соотношения протохлорофилл:хлорофилл а.

Изменения содержания каждого из пигментов представлены одновременно для всех вариантов на общей оси времени с отсчетом от начала освещения. Из рис. 1Б видно, что освещение прекращали в период лаг-фазы, длящейся около 2 час., на участках ускоренного (до 6 час.) и равномерного и быстрого накопления хлорофилла а. В отличие от хлорофилла а, содержание хлорофилла б увеличивается

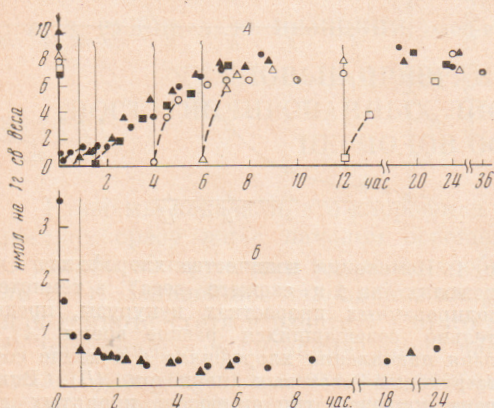


Рис. 3. Накопление протохлорофиллида (А) и изменение содержания протохлорофилла (Б) в темноте в этиолированных проростках кукурузы, предварительно освещавшихся разное время. Обозначения те же, что на рис. 1. На оси ординат на рис. 3А нанесены величины содержания протохлорофиллида в неосвещавшихся этиолированных проростках, использовавшихся в соответствующих вариантах опытов. Прерывистыми линиями показаны начальные участки накопления

и на раннем этапе зеленения (рис. 2Б, В). При затемнении растений в период лаг-фазы (1, 45 и 90 мин.) накопление хлорофилла а происходит главным образом за счет этерификации хлорофиллида, образующегося в первые мгновения освещения в результате фотовосстановления протохлорофиллида этиолированных листьев. Темновой уровень пигмента во всех трех вариантах одинаков (рис. 1А). Наличие света в этот период не вносит существенных изменений и в кинетику хлорофилла б. Накопление пигмента, величина достигаемого в темноте максимума, снижение содержания и конечный уровень хлорофилла б в описываемых вариантах практически одинаковы (рис. 2А). Таким образом, в первом приближении освещение растений вплоть до 1,5 час. не сказывается на темновых превращениях хлорофиллов, и пигмента происходит в рамках единых кривых. Отчасти это обусловлено слабым ресинтезом протохлорофиллида в период лаг-фазы (рис. 3А), за время которой образуется менее 10% пигмента по сравнению с его содержанием в этиолированном листе. Но даже и эта добавка может оказаться в действительности меньшей, если свежее образованный хлорофилл а, как было показано для зеленых листьев⁽⁶⁾, отличается пониженной фотоустойчивостью и частично разрушается на свету, не успев претерпеть дальнейших превращений. С другой стороны, в период лаг-фазы происходят иницируемые светом существенные перестройки структуры этиопласта. Как следует из приведенных данных, эти процессы лишь в малой степени затрагивают аппарат биосинтеза хлорофилла и, в частности, ферментную систему, обеспечивающую превращение хлорофилла а в хлорофилл б.

Отсутствие роста содержания хлорофилла б при затемнении растений в период ускоренного накопления пигментов (4 и 6 час.) можно объяснить относительной малостью метаболически активного подфона хлорофилла а на фоне уже значительного содержания хлорофилла б (рис. 2). Вместе с тем общий фонд хлорофилла б в этот период по-прежнему содержит заметное количество неустойчивого пигмента, о чем свидетельствует участок его убыли. После 12 час. освещения хлорофилл б находится главным образом в стабильном состоянии.

Начальная скорость ресинтеза протохлорофиллида в темноте, о которой можно судить по углу наклона прерывистых линий на рис. 3А, после первых трех световых экспозиций невелика, затем она резко возрастает, до-

стигая наибольшего значения после 6 час. освещения. В течение первых 12 час. освещения изменяются только начальные скорости. Конечный уровень, до которого накапливается протохлорофиллид, не меняется и практически совпадает с уровнем этого пигмента в этиолированных листьях до освещения. Этот эффект, наблюдавшийся нами ранее в опытах с импульсным освещением⁽²⁾, подтвержден недавно в аналогичных экспериментах Торна на фасоли⁽⁷⁾. Все кривые ресинтеза вписываются в конечном свете в кривую, полученную после минутного освещения.

Совершенно иначе ведет себя протохлорофилл. Сразу же после освещения содержание пигмента начинает убывать как на непрерывном свете, так и в темноте (рис. 3Б). Однако в первом случае протохлорофилл за несколько часов практически исчезает, тогда как во втором он длительное время сохраняется на некотором уровне.

В нашей лаборатории развивается представление о локализации биосинтеза хлорофилла в определенных участках пластиды — центрах биосинтеза, в которых процессы осуществляются специфическими полиферментными комплексами⁽⁸⁾. Можно предположить, что функциональные элементы, обеспечивающие биосинтез протохлорофиллида и, возможно, его дальнейшее превращение в хлорофилл, образовались в этиопласте развившегося этиолированного листа в определенном количестве, существенно не меняющемся в процессе формирования на свету пигментного аппарата. Число таких элементов и определяет конечный уровень темнового накопления протохлорофиллида. Их производительность регулируется таким образом, чтобы с оптимальной скоростью обеспечить пигментными компонентами функционально важные участки фотосинтетической единицы (на это может указывать совпадение периода увеличения скорости ресинтеза протохлорофиллида и наиболее быстрого роста отношения Хлб/Хла), а затем восполнять убыль пигментов, происходящую в процессе жизнедеятельности. Нельзя, однако, исключить возможность образования новых биосинтетических элементов⁽⁹⁾, скорость возникновения которых подвержена изменениям, но накапливающихся при затемнении лишь до определенного уровня.

Авторы благодарят Л. И. Фрадкина и А. А. Зенько за существенную помощь в налаживании флуоресцентной методики.

Лаборатория биофизики и изотопов
Академии наук БССР
Минск

Поступило
31 V 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Б. Рудой, А. А. Шлык, А. Ю. Везицкий, ДАН, 183, № 1, 215 (1968).
² А. А. Shlyk, A. B. Rudoi, A. Yu. Vezitskii, Photosynthetica, 4(1), 68 (1970).
³ Э. И. Зенкевич, А. П. Лосев, Журн. прикл. спектроскоп., 13, 6, 1032 (1970).
⁴ S. W. Thorne, N. K. Boardman, Plant Physiol., 47, 2, 252 (1971). ⁵ А. А. Шлык, Метаболизм хлорофилла в зеленом растении, Минск, 1965. ⁶ А. А. Шлык, Г. Н. Николаева, Биофизика, 8, 2, 201 (1963). ⁷ S. W. Thorne, Biochim. et biophys. acta, 226, 128 (1971). ⁸ А. А. Shlyk, I. V. Prudnikova et al., In: Progress in Photosynthesis Research, 2, Tübingen, 1969, p. 572. ⁹ А. А. Шлык, Г. Вальтер и др., ДАН, 193, № 6, 1429 (1970).