

Б. А. РУБИН, Л. А. ВОРОНКОВ, И. А. ПЕРОВА

**ТРАНСПОРТ ЭЛЕКТРОНОВ В ХЛОРОПЛАСТАХ ХЛОПЧАТНИКА
ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ВЕРТИЦИЛЛЕЗНЫМ ВИЛТОМ**

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 18 II 1972)

Вертициллезный вилт хлопчатника сопровождается появлением на листьях зараженного растения характерного хлороза. Наблюдаются изменения в пигментном составе больных листьев, уменьшается общая интенсивность фотосинтеза (¹, ²). Мало исследован вопрос о влиянии инфекции на специфические функции хлоропластов — транспорт электронов от воды к НАДФ и фотосинтетическое фосфорилирование. Это объясняется тем, что до недавнего времени не удавалось выделить из хлопчатника функционально активные хлоропласты. Главным препятствием является содержащийся в хлопчатнике госсипол — специфическое для рода *Gossipium* соединение полифенольной природы.

В результате проведенной методической работы мы получили хлоропласты хлопчатника, способные осуществлять циклическое фотофосфорилирование с феназинметасульфатом (ФМС). Было показано, что заражение хлопчатника вертициллезным вилтом значительно ингибирует этот путь запасаения энергии (³).

Синтез АТФ при нециклическом фотофосфорилировании сопряжен с транспортом электронов от воды к НАДФ. В данной работе изучали воздействие инфекции на реакцию Хилла в хлоропластах хлопчатника в отсутствие экзогенных кофакторов фосфорилирования и при добавлении в реакционную среду АДФ, F_n и Mg^{2+} . В качестве акцептора электронов использовали феррицианид калия.

Таблица 1

Влияние добавления сывороточного альбумина в среду выделения хлоропластов на реакцию Хилла

Среда выделения	рН	Время освещения, мин.	ΔD^*	Количество хлорофилла, мг	и мол. $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$
					мг хлорофилла за 10 мин.
0,3 M NaCl 0,5 M сахараза 0,05 M трис-НСI-буфер То же	7,8	10	0,017	0,064	—
+3% сывороточный альбумин	7,8	10	0,510	0,061	32,7

* ΔD — разница в оптической плотности при λ 420 м μ между темновым и световым вариантом.

В предварительных опытах было показано, что при выделении хлоропластов хлопчатника в стандартной среде, содержащей трис-буфер, сахарозу и NaCl, происходит темновое восстановление феррицианида, равное или превосходящее по величине восстановление феррицианида при освещении.

щении хлоропластов. Аналогичное явление наблюдали Mathre и Fry (⁴, ⁵). Известно, что сывороточный альбумин образует с госсиполом соединения типа ди- и тримеров (⁶). Мы использовали это свойство альбумина для освобождения от госсипола в момент выделения хлоропластов. В табл. 1 показано, что при добавлении в среду выделения 3% сывороточного альбумина удается снять эффект темнового восстановления феррицианида хлоропластами хлопчатника и получить реакцию Хилла. Все последующие эксперименты проводили с хлоропластами хлопчатника, выделенными в среде, содержащей 0,3 M NaCl, 0,5 M сахарозу, 0,05 M трис-HCl-буфер, pH 7,8 и 3% сывороточный альбумин. Реакцию Хилла определяли по восстановлению феррицианида калия в среде, содержащей в 3 мл: 104 μ моля NaCl, 45 μ мол. трис-HCl, pH 7,8, 3 μ моля $K_3Fe(CN)_6$, суспензию хлоропластов (50–100 μ г хлорофилла). В вариантах с АДФ, Φ_n и Mg^{2+} в среду добавляли 10 μ мол. $MgCl_2$, 10 μ мол. АДФ, 10 μ M K, Na-фосфатный буфер, pH 7,8. Время освещения 10 мин., освещенность 40 000 лк, температура +18° – +20°. После выключения света пробы фиксировали 10% ТХУ, центрифугировали и в супернатанте определяли $K_3Fe(CN)_6$ спектрофотометрически при λ 420 м μ . Количество восстановленного феррицианида выражали в μ молях $K_3Fe(CN)_6$ на 1 мг хлорофилла в час. Хлорофиллы определяли по Арнону (⁷).

Заражение хлопчатника вертициллезным вилтом проводили методом инъекции в стебель суспензии конидий *Verticillium dahliae* (концентрация суспензии 100 000 конидий/мл, возраст растений – 1,5–2 мес.). В ряде работ показано, что конидии *Verticillium*, попав в проводящую систему хлопчатника, довольно быстро распространяются по растению. По-видимому, с самого начала инфекции принимает системный характер (⁸). Было интересно провести исследование фотохимической активности хлоропластов хлопчатника в процес-

Таблица 2
Влияние заражения вертициллезным вилтом на фотовосстановление феррицианида хлоропластами хлопчатника *

Срок от момента заражения, дни	Вариант	Нефосфорилирующие условия	+АДФ, Φ_n , Mg^{2+}
3	Здоровый лист верхнего яруса	157,9	193,4
		100,0	100,0
	Больной лист верхнего яруса	132,8	169,4
		84,1	87,6
	Здоровый лист среднего яруса	114,4	150,4
		100,0	100,0
Больной лист среднего яруса	87,7	100,5	
	76,6	66,5	
15	Здоровое растение	82,5	114,9
		100,0	100,0
	Больной лист (зеленые участки)	52,5	89,8
		63,6	78,2
	Больной лист (желтые участки)	37,7	76,9
		45,7	66,9

* Числа над чертой – μ мол. $K_3Fe(CN)_6$ /мг хлорофилла в час, под чертой – проценты.

ингибирования циклаического фотофосфорилирования (³), наблюдается действие инфекции на перенос электронов от воды к феррицианиду. Ингибирование транспорта электронов происходит как в отсутствие кофакторов фосфорилирования, так и при добавлении в реакционную среду АДФ, Φ_n , Mg^{2+} . Наблюдаемое ингибирование реакции Хилла в листьях верхнего и среднего яруса под-

тверждает представление о системном характере инфекции. По мере развития болезни происходит все более значительное подавление фотохимической активности хлоропластов. Количество феррицианида, восстановленного при освещении хлоропластов из зеленых участков больных листьев, составляет 64% от контроля, в хлоротичных участках эта величина равна 46%. Уменьшение интенсивности реакции Хилла в хлоропластах из зе-

Таблица 3

Стимуляция транспорта электронов в хлоропластах хлопчатника при добавлении в реакционную среду АДФ, фосфата и Mg^{2+} , $[(+P) - (-P)]/(-P)$

Здоровый лист верхнего яруса	Больной лист верхнего яруса	Здоровый лист среднего яруса	Больной лист среднего яруса	Здоровое растение	Зеленые участки больных листьев	Желтые участки больных листьев
22,5	27,6	31,6	21,5	40,0	71,1	104,6

* $[(+P) - (-P)]/(-P)$ — величина стимуляции потока электронов, выраженная как отношение увеличения количества восстановленного феррицианида при добавлении в среду АДФ, Φ_n и Mg^{2+} к количеству феррицианида, восстановленного в среде без этих компонентов.

ленных и хлоротичных участков больных листьев наблюдается и в фосфорилирующих условиях, однако в этом случае процент ингибирования меньше, чем в вариантах с АДФ, Φ_n и Mg^{2+} .

Одной из причин этого может быть различный уровень стимуляции потока электронов при добавлении кофакторов фосфорилирования к хлоропластам из здоровых и зараженных растений. Из табл. 3 видно, что в хлоропластах из здоровых растений уровень стимуляции потока электронов не превышает 25–40%. На третий день после заражения хлопчатника вертициллезным вилтом величина стимуляции потока электронов по сравнению с контролем не изменяется. Добавление кофакторов фосфорилирования к хлоропластам из больных листьев на поздних стадиях инфекции вызывает большую стимуляцию потока электронов: до 71% для зеленых участков больных листьев и свыше 100% для желтых участков.

Таким образом, можно отметить тенденцию к увеличению стимуляции потока электронов при добавлении АДФ, Φ_n и Mg^{2+} по мере развития болезни. Просветление, а затем и пожелтение больных листьев отражает деструкцию фотосинтетического аппарата, и, следовательно, значительная стимуляция потока электронов в хлоропластах при добавлении кофакторов фосфорилирования не может быть в данном случае связана с увеличением сопряженности потока электронов с фотофосфорилированием. В то же время имеются работы, где выявлена зависимость стимуляции транспорта электронов от содержания эндогенного фосфата в хлоропластах. Показано, что меньшему содержанию эндогенного фосфата соответствует большая стимуляция потока электронов при добавлении в реакционную среду АДФ, Φ_n и Mg^{2+} (9). Известно, что заражение хлопчатника вертициллезным вилтом сопровождается изменением содержания в больных растениях различных фракций фосфора (10). Можно предположить, что одной из причин значительной стимуляции потока электронов может быть уменьшение содержания в хлоропластах больных растений эндогенного фосфата.

Стимуляция потока электронов при добавлении к хлоропластам из больных листьев АДФ, Φ_n и Mg^{2+} , значительно превосходящая стимуляцию потока в здоровых растениях, на поздних этапах развития болезни создает впечатление уменьшения ингибирования реакции Хилла в фосфорилирующих условиях по сравнению с вариантом без АДФ, Φ_n и Mg^{2+} . На самом же деле, если в первые дни после заражения основным фактором, воздей-

ствуюющим на транспорт электронов, по-видимому, являются токсины патогена, то по мере развития деструктивных явлений в клетке изменения реакции Хилла отражают воздействие на цепь переноса электронов и других факторов. Возможно, одним из них является уменьшение содержания в хлоропластах эндогенного фосфата. Этот вопрос изучается нами в настоящее время.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
12 II 1972

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ Ф. Б. Оршанская, Бюлл. Гл. бот. сада, в. 61, 79 (1966). ² Н. Н. Назаров, Докл. АН УзССР, № 6, 44 (1960). ³ Б. А. Рубин, Л. А. Воронков, И. А. Перова, Докл. ВАСХНИЛ, № 3 (1972). ⁴ D. E. Mathre, *Phytopathology*, 58, 2 (1968). ⁵ K. Fry, *Plant Physiology*, 45, 465 (1970). ⁶ C. M. Lyman et al., *Arch. Biochem. and Biophys.*, 84, 2 (1959). ⁷ D. I. Arnon, *Plant Physiol.*, 24, 1 (1949). ⁸ J. T. Prestly et al., *Phytopathology*, 56, 3 (1966). ⁹ B. Frackowiak et al., *Biochim. et biophys. acta*, 226, 360 (1971). ¹⁰ К. А. Малышева, А. Адлова, Билт хлопчатника, Ташкент, 1966.