

Член-корреспондент АН СССР А. А. ШЛЫК, Н. Н. КОСТЮК

О РЕГУЛИРОВАНИИ ПРОЦЕССА ХЛОРОФИЛЛООБРАЗОВАНИЯ
В ЗЕЛЕННЫХ ЛИСТЯХ ЯЧМЕНЯ

Накопление образующегося из δ -аминолевулиновой кислоты (АЛК) предшественника хлорофилла — протохлорофиллида — в темноте идет лишь до некоторого определенного уровня как в этилированных проростках (¹), так и при затемнении зеленых растений (²). Прекращение накопления протохлорофиллида объясняется разрушением или переходом в неактивное состояние АЛК-синтетазы, которая во многих случаях является ключевым ферментом всего процесса биосинтеза хлорофилла (¹⁻³). О существовании контроля на этом этапе говорит (³) образование больших количеств протохлорофиллида при снабжении этилированных листьев внешней АЛК. Частичное преодоление действия ингибиторов белкового синтеза на биосинтез хлорофилла при введении АЛК в этилированные листья также рассматривается некоторыми авторами (⁴) как доказательство локализации регулирующего звена хлорофиллообразования на стадии АЛК. Кирк (^{5, 6}) полагает, однако, что основой контроля биосинтеза хлорофилла в зеленеющих листьях может быть скорее образование белка — носителя пигмента. Не исключается возможность сопряжения энзиматических и структурных функций белка в рамках несущих хлорофилл-синтетазу центров биосинтеза (⁷).

Целью данной работы явилось исследование основных закономерностей биосинтеза хлорофилла в условиях снабжения избыточной АЛК, а также совместного действия ингибитора белкового синтеза хлорамфеникола (ХАФ) и АЛК на этот процесс в полностью закончившей формирование хлоропластов ткани зеленого листа, где синтез хлорофилла служит для поддержания его постоянно обновляющегося фонда (²). Об эффективности синтеза хлорофилла судили по темновому накоплению и последующему фотовосстановлению протохлорофиллида.

7-дневные растения ячменя, выращенные в условиях водной культуры под люминесцентными лампами ЛБ-30, создававшими освещенность 3000 лк при световом режиме 18 час. в сутки, помещали корнями на раствор АЛК с концентрацией 0,6; 2,4; 10 мМ (рН около 5) или на дистиллированную воду и сразу же переносили в полную темноту. Часть растений каждого варианта спустя 22 часа пребывания в темноте перемещали на свежеприготовленный раствор АЛК с концентрацией 10 мМ. В течение пребывания растений в темноте периодически брали пробы. В других опытах растения, получавшие АЛК или совместно ХАФ и АЛК по описанной ранее методике (⁸), после 24 час. затемнения освещали белым светом низкой (70 лк) интенсивности. Пробы фиксировали 2 мин. горячим паром. Для анализа использовали верхние 2 см первого листа, взятые на расстоянии 0,5 см от верхушки. Количество хлорофилла а в этаноловых экстрактах находили по (⁹). Содержание протохлорофиллида определяли спектрофлуорографически (¹⁰). В работе применяли относительную (ммоли протохлорофиллида на 1 моль хлорофилла а) и абсолютную (пмоли в одном отрезке листа) оценки количества пигмента.

На рис. 1 показано темновое накопление протохлорофиллида в зеленых листьях ячменя в присутствии различных концентраций АЛК или воды. Накопление пигмента в водном варианте практически прекращается после

5 час. затемнения, и достигнутый уровень содержания протохлорофиллида, превышающий в 3 раза исходный световой, в дальнейшем сохраняется постоянным. С увеличением концентрации АЛК накопление пигмента в первые часы темноты возрастает. В варианте с концентрацией АЛК 10 мМ накопление пигмента прекращается к 22 час. затемнения. Количество протохлорофиллида к этому времени превышает первоначальное его содержание в 50 раз в расчете на хлорофилл а и в 45 раз по абсолютной оценке (затемнение приводит к некоторой убыли хлорофилла). Это значительно больше, чем 10-кратное увеличение, наблюдавшееся для этиолированных проростков с той же концентрацией АЛК (^{3, 11}). Контрольное снабжение свежеприготовленным раствором АЛК (кривая 1') после прекращения накопления протохлорофиллида не приводит к новому подъему в содержании пигмента, что говорит против возможного объяснить это

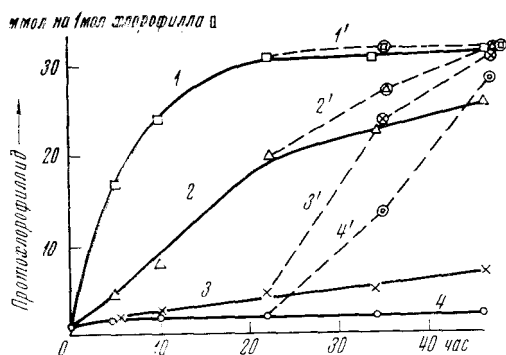


Рис. 1

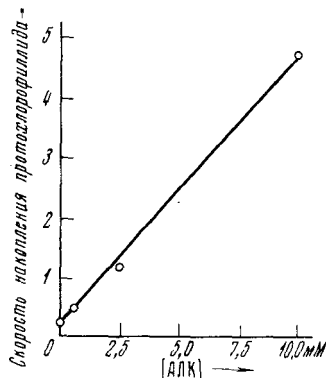


Рис. 2

Рис. 1. Изменение содержания протохлорофиллида при затемнении зеленых листьев ячменя в присутствии различных концентраций АЛК: 10 мМ (1), 2,4 мМ (2), 0,6 мМ (3) или без нее (4) и после переноса части растений каждого варианта на раствор АЛК с концентрацией 10 мМ (соответственно 1', 2', 3', 4)

Рис. 2. Зависимость скорости накопления протохлорофиллида в начальный момент затемнения зеленых листьев ячменя от концентрации внешней АЛК

прекращение истощением АЛК в растворе. Накопление протохлорофиллида при затемнении в присутствии более низких концентраций АЛК происходит медленнее, не достигая за время опыта насыщающего уровня. Существование предела в накоплении пигмента подтверждается при перемещении части растений всех вариантов на раствор АЛК с концентрацией 10 мМ. Такой перенос приводит к достижению уровня насыщения практически во всех вариантах опять-таки за 20 час., причем чем выше содержание пигмента в момент переноса, тем ниже скорость его дальнейшего накопления. Чтобы определить характер зависимости скорости накопления протохлорофиллида от концентрации АЛК, были вычислены тангенсы углов наклона начальных участков кинетических кривых. Из рис. 2 видно, что начальная скорость прямо пропорциональна концентрации раствора внешней АЛК. Достижение же в дальнейшем уровня насыщения говорит о наличии в зеленых листьях внутренних факторов, контролирующих образование протохлорофиллида даже при обильном снабжении избыточной АЛК.

Как отмечено Граником, накопление больших количеств протохлорофиллида при подкормке этиолированных растений АЛК означает, что в них присутствуют все ферменты, ответственные за превращение АЛК в протохлорофиллид, и что причина остановки синтеза пигмента без внешней АЛК лежит на стадии ее образования (³). Проведенное нами изучение кинетики накопления протохлорофиллида при снабжении зеленых листьев ячменя раствором АЛК различной концентрации показало, вместе с тем,

что процесс образования протохлорофиллида и при избытке АЛК также не протекает бесконечно долго и встречает дальнейшие ограничения. Если потенциальные возможности хлорофилл-синтетазы на всех этапах после АЛК вначале столь велики, что позволяют ей ответить на введение АЛК пропорциональным увеличением скорости образования протохлорофиллида, то избыточное накопление последнего все же возможно лишь до некоторого предела несмотря на обильное снабжение АЛК. Далее следует выяснить, в какой мере механизм такой остановки процесса связан с изменениями собственно хлорофиллсинтезирующего аппарата, а в какой затрагивает и более общую реакцию растений на введение больших количеств АЛК: накопление пигмента и так далее.

Способность части образованного из внешней АЛК протохлорофиллида этилопированных проростков к фотовосстановлению была показана рядом

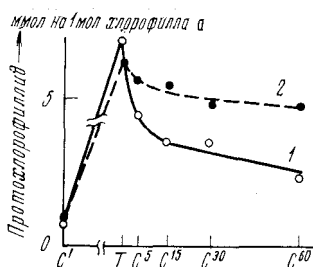


Рис. 3. Кинетика светового превращения протохлорофиллида, накопленного за 24 часа затемнения в присутствии АЛК зелеными растениями ячменя, которые предварительно были выдержаны на растворе ХАФ (2) или в воде (1). C' — содержание протохлорофиллида до затемнения; T — содержание протохлорофиллида в темноте; $C'(5, 15, 30, 60)$ — содержание протохлорофиллида после освещения (цифры — число минут освещения)

авторов (¹²⁻¹⁴). На рис. 3 приведены средние данные серии опытов, характеризующие изменение содержания протохлорофиллида, накопившегося в темноте в присутствии 0,6 мМ АЛК в растениях хлорамфеникольного и водного вариантов, при освещении (70 лк), низкая интенсивность которого была избрана для устранения фоторазрушения АЛК-протохлорофиллида, отличающегося большой лабильностью (¹⁵). То, что пигмент, образующийся в темноте в зеленых листьях, снабженных АЛК такой концентрации, представлен главным образом АЛК-протохлорофиллидом, установлено ранее (⁸). Количество протохлорофиллида в листьях хлорамфеникольного и водного вариантов до затемнения заметно не различалось. Темновое же накопление пигмента при снабжении АЛК в присутствии ХАФ несколько ниже (статистическая надежность этого различия была показана (⁸)). Попарное сравнение процентов убыли протохлорофиллида во время освещения показало статистически надежное различие уже первых точек в обоих вариантах ($P < 0,05$). Оно еще более усиливается в дальнейшем. Доля фотовосстановленного за 60 мин. пигмента по отношению к накопившемуся в темноте для варианта с антибиотиком составляет лишь $36 \pm 12\%$, тогда как в водном варианте она достигает $83 \pm 9\%$. Количество же пигмента, остающегося невосстановленным, много больше в обработанных ХАФ листьях. Аналогичная кинетика восстановления АЛК-протохлорофиллида наблюдалась и по изменению абсолютного содержания пигмента. Таким образом, действие ХАФ сказывается не только на уровне темнового накопления АЛК-протохлорофиллида, но и на активности этого пигмента в процессе фотовосстановления. В присутствии ингибитора накапливается в основном фотобиохимически неактивный пигмент.

На основании того, что при освещении этилопированных растений, обработанных антибиотиками, наблюдаются обычные спектральные проявления перехода протохлорофиллида в хлорофилл, Гассман и Богорад (¹⁶) пришли к выводу, что ингибиторы типа ХАФ не мешают нормальному фотовосстановлению активной формы протохлорофиллида. Эти авторы (⁴) заключили, что ограничение в образовании протохлорофиллида связано с недостатком только АЛК, но не носителя. В противоположность этому Кирк (^{5, 6}) предполагает, что действие ХАФ направлено на образование белка-голохрома. Надлер и Граник (¹⁴) отметили, что действие ингибиторов в

течение 6—12 час. зеленения снимается введением АЛК, и заключили, что синтез хлорофилла регулируется образованием АЛК-синтетазы, все же другие ферменты, а также голохромный белок, необходимый для фотовосстановления протохлорофиллида, не являются ограничивающими. Однако при более длительной экспозиции ХАФ все-таки уменьшает накопление хлорофилла даже из внешней АЛК.

В проведенных нами экспериментах с одновременным использованием ХАФ и АЛК установлено действие ХАФ не только на темновое накопление протохлорофиллида, но и на активность такого пигмента в фотопревращении. В общем фонде образовавшегося в присутствии ХАФ протохлорофиллида особенно значительную долю составляет фотобиохимически неактивный пигмент, неспособность которого к восстановлению может быть обусловлена отсутствием нормальной связи пигмента с белком-носителем и (или) нарушением снабжения донором водорода.

Из полученных данных следует вывод о том, что регулирование процесса хлорофиллообразования связано не исключительно с активностью АЛК-синтетазы, но и с формированием иных ферментов, а также структурных белков, среди которых первостепенное значение имеет, вероятно, белок-носитель пигмента. Лимитирующее действие этих факторов отчетливо обнаруживается в таких условиях, когда АЛК присутствует в достаточных количествах.

Лаборатория биофизики и изотопов
Академии наук БССР
Минск

Поступило
1 VI 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. I. Virtin, *Physiol. Plant.*, **8**, 630 (1955). ² А. А. Шлык, *Метаболизм хлорофилла в зеленом растении*, Минск, 1965. ³ С. Граник, В сборн. *Механизм фотосинтеза*, Тр. V Международн. биохимич. конгр., Симпозиум VI, М., 1962, стр. 184. ⁴ M. Gassman, L. Bogorad, *Plant Physiol.*, **42**, 774 (1967). ⁵ J. T. O. Kirk, R. L. Allen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **21**, 523 (1965). ⁶ J. T. O. Kirk, *Planta*, **78**, 200 (1968). ⁷ A. A. Shlyk, I. V. Prudnikova et al., *Progress in Photosynthesis Research*, **11**, 572 (1969). ⁸ А. А. Шлык, Н. Н. Ростюк, *ДАН*, **202**, 707 (1972). ⁹ J. F. G. M. Winternans, A. de Motts, *Biochim. et biophys. acta*, **109**, 448 (1965). ¹⁰ А. А. Шлык, Г. Е. Савченко, Н. Г. Аверина, *Биофизика*, **14**, 119 (1969). ¹¹ В. А. Калер, Г. М. Подчуфарова, В сборн. *Физиолого-биохимические исследования растений*, Минск, 1965. ¹² E. S. Sisler, W. H. Klein, *Physiol. Plant.*, **16**, 315 (1963). ¹³ C. Sundqvist, *Physiol. Plant.*, **22**, 147 (1969). ¹⁴ K. Nadler, S. Granick, *Plant. Physiol.*, **46**, 240 (1970). ¹⁵ S. Klein, L. Bogorad, *J. Cell. Biol.*, **22**, 443 (1964). ¹⁶ M. Gassman, L. Bogorad, *Plant Physiol.*, **42**, 781 (1967).