

Л. К. ОСТРОВСКАЯ, М. С. ГАМАЮНОВА, С. М. КОЧУБЕЙ,
М. Ю. ГРИГОРА, А. М. СИЛАЕВА, А. М. ЯКОВЕНКО

**НЕКОТОРЫЕ СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
ФРАГМЕНТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ФОТОСИСТЕМУ I, ИЗ ЛАМЕЛЛ
СТРОМЫ И ЛАМЕЛЛ ГРАН ХЛОРОПЛАСТОВ**

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 27 X 1972)

В последние годы в лаборатории Арнона (¹⁻³) развивается концепция трех световых реакций в световой фазе фотосинтеза. Согласно ей, система нециклического транспорта электронов включает две последовательно функционирующие коротковолновые световые реакции IIa и IIb. Фотореакция IIa включает транспорт электронов от цитохрома b_{559} и пластоцианина к ферредоксину и НАДФ. Параллельно фотосистеме II функционирует длинноволновая фотосистема I, осуществляющая циклический транспорт электронов, компонентами которой являются цитохромы b_6 и f .

В лаборатории Требста (⁴) было высказано предположение, что в хлоропластах *in vivo* имеются две пространственно разобщенные, но сходные по функциям фотосистемы I, в которых цепь электронного транспорта включает либо пластоцианин, либо цитохром f . Одна из них, в состав которой входит пластоцианин, участвует в нециклическом транспорте электронов от воды, другая, включающая цитохром f , осуществляет циклический транспорт электронов. Якоби (^{5, 6}) также высказал предположение о существовании в ламеллярной системе хлоропластов двух типов частиц, содержащих фотосистему I, причем одна из них более тесно связана с фотосистемой II в гранях хлоропластов.

В настоящей работе сделана попытка выделения и исследования свойств двух типов частиц, содержащих фотосистему I.

Объектами исследования служили хлоропласты 2-недельных растений гороха сорта Рамонский 77 и 4-недельных растений кукурузы гибрид Буковинский 3. Хлоропласты гороха выделяли по методу, описанному ранее (⁷), фрагменты хлоропластов паренхимной обкладки сосудисто-волокнистых пучков и мезофилла кукурузы — методом, разработанным в отделе.

Фрагментацию хлоропластов гороха производили инкубированием с 0,3% дигитонином в течение 15 мин. при 0°С, в темноте (соотношение дигитонин: хлорофилл 3:1); затем суспензию фракционировали дифференциальным центрифугированием последовательно при 1, 3, 20, 70, 100 и 145 тыс. *g*, используя для дальнейших исследований осадок, полученный при 145 тыс. *g* и представляющий собой, согласно данным, полученным в лаборатории Парка (^{8, 9}), частицы фотосистемы I из ламелл стромы хлоропластов, именуемые далее фракция I. Осадок, полученный при 20 тыс. *g*, предварительно очищенный центрифугированием в градиенте сахарозы (15–50%) или трехкратной промывкой буфером и представляющий собой смесь интактных и частично разрушенных гран хлоропластов, подвергали повторной инкубации с 0,3% дигитонином (при том же соотношении дигитонин: хлорофилл) в течение 15 мин. в ледяной бане при 2,3°С при освещенности 50 тыс. лк, добавлении 5 мМ $MgCl_2$ (¹⁰) и постоянном перемешивании. Из суспензии дифференциальным центрифугированием, как указано выше, выделяли фракцию легких частиц, осаждаемую при 145 тыс. *g*, содержавших фотосистему I из гран хлоропластов, име-

Скорость фотовосстановления НАДФ⁺ фрагментами хлоропластов гороха и кукурузы в зависимости от присутствия экзогенного пластоцианина

№ опыта	Растение	Фрагменты хлоропластов	Отношение хл. а./хл. в	Восстановленный НАДФ ⁺ на 1 мг хлорофилла за 1 час, μ мол		% повышения активности за счет пластоцианина
				без Пц	+ Пц	
1	Горох	Фракция I	4,9	57,8	70,7	22
		IIa	2,8	18,7	84,0	328
2		I	7,9	19,9	25,6	28
		IIa	4,4	1,8	56,8	3053
1	Кукуруза	Обкладка	4,9	3,2	4,2	29
		Мезофилл	2,4	3,9	13,7	345
2		Обкладка	6,6	21,7	27,2	25
		Мезофилл	2,9	5,8	22,3	287

нуемую далее фракция II. Эту фракцию использовали в спектральных и электронно-микроскопических исследованиях; для фотохимических реакций использовали смесь легких частиц, остающихся в супернатанте после осаждения при 20 тыс. *g* тяжелых фрагментов (фракция IIa).

Содержание хлорофилла в суспензиях хлоропластов и их фрагментов определяли по Арнону⁽¹¹⁾, соотношение этих пигментов — используя коэффициенты Вернона⁽¹²⁾. Пластоцианин выделяли из листьев кукурузы модифицированным методом Като⁽¹³⁾, ферредоксин — из листьев гороха по методу Тагава и Арнона⁽¹⁴⁾. Скорость фотовосстановления НАДФ⁺ определяли спектрофотометрически по изменению оптической плотности реакционной смеси при 340 м μ . Спектры флуоресценции при 77° K, возбуждаемые светом от лампы ДРШ-250 с фильтром СЗС-9, выде-

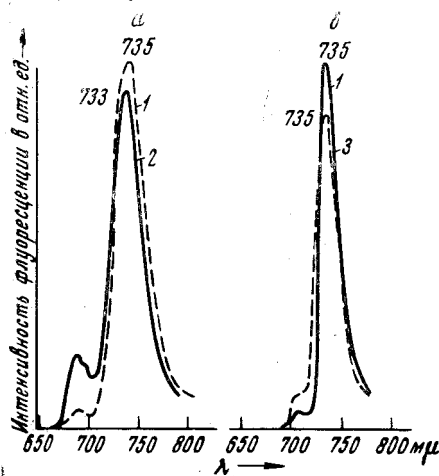


Рис. 1. Спектры низкотемпературной флуоресценции легких фрагментов из хлоропластов гороха и тяжелых фрагментов из хлоропластов обкладки кукурузы: а — фрагменты фракции I (1) и фракции II (2) из хлоропластов гороха и тяжелых фрагментов из хлоропластов обкладки кукурузы (3). Относительные концентрации окислителя и восстановителя: 1 — окислитель : хлорофилл = 100 : 1, восстановитель : хлорофилл = 10 : 1, 2 — окислитель : хлорофилл = 100 : 1, восстановитель : хлорофилл = 100 : 1

ляли фильтром ОС-11 и монохроматором с дифракционной решеткой МДР-2 (спектральная ширина щели 0,4–0,7 м μ). Дифференциальные спектры поглощения «окисленный — восстановленный» измеряли на спектрофотометре СФ-10, чувствительность которого была увеличена до $5 \cdot 10^{-5}$ единиц оптической плотности⁽¹⁵⁾.

Средняя величина отношения хлорофилла а : в во фракциях I и II составляла 5,0 и 4,0 соответственно; в различных опытах эти величины колебались в пределах 3,2–7,9 для фракции I и 2,8–5,5 для фракции II.

При сравнении уровня фотохимической активности этих фракций основным тестом служила их реакция на экзогенный пластоцианин при фотовосстановлении НАДФ⁺ с системой искусственных доноров электронов. У частиц фракции II пластоцианин значительно стимулировал фотовосстановление НАДФ⁺, тогда как частицы фракции I практически не нуждались в нем (табл. 1).

Эти результаты позволили сделать заключение о возможных различиях в организации фотосистемы I в ламеллах стромы и ламеллах гран. Предварительное изучение некоторых спектральных характеристик частиц, содержащих фотосистему I, из ламелл гран и ламелл стромы в известной мере подтверждает такое предположение.

В спектрах поглощения у частиц фракции II при 20°С более четко выделяется плечо около 659 мμ, т. е. в области поглощения хлорофилла b. В спектре низкотемпературной флуоресценции этих частиц видны три полосы: 685, 693 (плечо) и 733 мμ. Отношение интенсивностей полос 685 и 733 мμ порядка 0,25; величина этого же отношения для частиц фракции I 0,05—0,10 (рис. 1).

Длинноволновая полоса в спектре флуоресценции частиц фракции II принадлежит хлорофилл-липопротеидному комплексу, по-видимому, несколько иного строения или состава, чем тот, который содержится в частицах фракции I и имеет максимум при 735 мμ. В пользу такого предположения свидетельствует более коротковолновое положение максимума этой полосы в спектре частиц фракции II. При хранении на холоде (24 часа) или обработке галактодипазой больший сдвиг длинноволновой полосы обнаруживается в спектре флуоресценции частиц фракции II.

В дифференциальном спектре поглощения «окисленный — восстановленный» частиц фракции II видна полоса с максимумом 700 мμ (рис. 2). Однако спектр, подобный по форме дифференциальному спектру частиц фракции I, удается получить при ином соотношении окислителя и восстановителя.

Наличие химически индуцированных изменений поглощения при 700 мμ, а также характерный рисунок спектра низкотемпературной флуоресценции позволяют предполагать присутствие в частицах фракции II пигмента P₇₀₀. Рассмотрение же особенностей строения спектров поглощения и флуоресценции этой фракции дает право считать, что они несколько отличаются по организации и, возможно, составу от частиц фракции I.

Исследование липидного состава в известной мере подтвердило это предположение: частицы фракции I оказались заметно обогащенными галактолипидами по сравнению с частицами фракции II.

Солюбилизация полученных частиц 2% раствором детергента Тритон X-100 и разделение солюбилизированного материала диск-электрофорезом в полиакриламидном геле позволили обнаружить на электрофореграммах из обоих типов частиц две четкие полосы пигмент-белковых комплексов. Однако на электрофореграмме фракции I, кроме того, имела четкая полоса не связанного с пигментом белка, отсутствовавшая на электрофореграмме фракции II.

Как известно, хлоропласты у ряда видов растений с так называемым C₄-путем фотосинтетического метаболизма CO₂, в том числе у кукурузы,

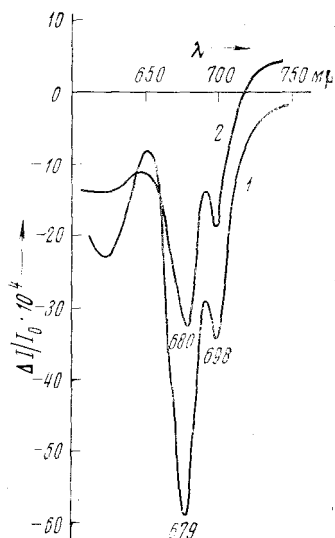


Рис. 2. Дифференциальные спектры «окисленный — восстановленный» фракций I (1) и II (2) из хлоропластов гороха

подразделяются на два качественно различных типа (¹⁶⁻¹⁸). В гранальных хлоропластах мезофилла у растений этого типа присутствуют и функционируют I и II фотосистемы. В хлоропластах же паренхимной обкладки сосудисто-волокнистых пучков, не содержащих гран, по данным ряда исследователей присутствует только фотосистема I, осуществляющая циклический транспорт электронов (^{19, 20}). Учитывая это и исходя из предположения об идентичности основных характеристик частиц фотосистемы I из ламелл стромы в хлоропластах различных видов растений, мы повторили исследования фотохимических и спектральных характеристик на фрагментах, полученных из хлоропластов паренхимной обкладки сосудисто-волокнистых пучков и хлоропластов мезофилла кукурузы.

Фрагменты хлоропластов кукурузы получали по разработанной в нашем отделе методике, механическим способом, без применения детергентов. В исследованиях использовали фракции фрагментов хлоропластов обкладки и мезофилла, осаждавшиеся при центрифугировании при 25 тыс. g (после 4 тыс. g).

Результаты исследований показали, что фрагменты хлоропластов обкладки, представлявшие собой крупные перфорированные мембраны, обладали высоким отношением хлорофилла а: b (4,9—9,5) и были лишены способности к реакции Хилла с феррицианидом. Спектр низкотемпературной флуоресценции (рис. 1) и степень зависимости фотовосстановления НАДФ⁺ от присутствия в реакционной смеси экзогенного пластоцианина (табл. 1) оказались весьма сходными с этими показателями у частиц фракции I из ламелл стромы хлоропластов гороха. У фрагментов из хлоропластов мезофилла, представлявших собой смесь частично разрушенных гран хлоропластов и отдельных дисков, потребность в экзогенном пластоцианине для фотовосстановления НАДФ⁺ была выражена весьма четко (табл. 1).

Таким образом, можно заключить, что содержащие фотосистему I частицы ламелл стромы и ламелл гран хлоропластов различаются по составу, спектральным и фотохимическим характеристикам. Различия потребности в экзогенном пластоцианине для проявления фотохимической активности фотосистемы I у полученных частиц позволяют предположить, что первичным донором электронов для R_{700} в частицах фотосистемы I из ламелл стромы является пситхром f, а в частицах фотосистемы I из ламелл гран — пластоцианин. Однако эти результаты могут свидетельствовать также о том, что в частицах фотосистемы I из ламелл гран хлоропластов пластоцианин связан менее прочно, чем в частицах фотосистемы I из ламелл стромы.

Институт физиологии растений
Академии наук УССР
Киев

Поступило
27 X 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. I. Arnon, *Biochemistry of Chloroplasts*, 2, London—N. Y., 1967, p. 461.
- ² D. B. Knaff, D. I. Arnon, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **64**, 2, 715 (1969).
- ³ D. B. Knaff, D. I. Arnon, *Biochim. et biophys. acta*, **226**, 2, 400 (1971).
- ⁴ E. Elstner, E. Pistorius et al., *Planta*, **79**, 2, 146 (1968). ⁵ G. Jacobi, H. Lehmann, *Zs. Pflanzenphysiol.*, **59**, 5, 457 (1968). ⁶ G. Jacobi, *ibid.*, **61**, 3, 203 (1969). ⁷ Т. А. Рейнгард, М. С. Гамаюнова, С. В. Мануильская, Сборн. Пути повыш. интенси. и продукт. фотосинтеза, в. 2, Киев, 1967, стр. 23.
- ⁸ P. V. Sane, R. B. Bark, *Plant Physiol. Suppl.*, **46**, 22, Ref. 119 (1970). ⁹ D. J. Goodchild, R. B. Park, *Biochim. et biophys. acta*, **226**, 2, 393 (1971).
- ¹⁰ R. Ohki, R. Kunieda, A. Takamiya, *ibid.*, **226**, 1, 144 (1971). ¹¹ D. I. Arnon, *Plant Physiol.*, **24**, 1, 1 (1949). ¹² А. А. Шлык, Биохимия, **33**, 2, 275 (1968). ¹³ S. Kato, G. Shiratory, A. Takamiya, *J. Biochem.*, **51**, 1, 32 (1962). ¹⁴ M. Losada, D. I. Arnon, In: *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, 7, Berlin, 1964, p. 592. ¹⁵ С. М. Кочубей, Е. Г. Самохвал, Физиол. и биохим. культурных растений, **4**, 2 (1972). ¹⁶ M. D. Hatch, C. R. Slack, *Biochem. J.*, **102**, 2, 417 (1967). ¹⁷ W. M. Laetsch, *Sci. Progr.*, **57**, 227, 323 (1969). ¹⁸ Ю. С. Карпилов, Фотосинтез ксерофитов, Кишинев, 1970. ¹⁹ K. C. Woo, J. M. Anderson et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **67**, 1, 18 (1970). ²⁰ J. M. Anderson, K. C. Woo, N. K. Boardman, *Biochim. et biophys. acta*, **245**, 2, 398 (1971).