Доклады Академии наук СССР
1974. Том 215, № 4

УДК 581(132+174)+541.144.7+58.1.0.35 *ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ*

Член-корреспондент АН СССР А. А. ШЛЫК, С. Н. ШЕВЧУК, В. И. ГАПОНЕНКО

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФИТОХРОМНОЙ СИСТЕМЫ НА ПРОЦЕСС ХЛОРОФИЛЛООБРАЗОВАНИЯ В ПОСТЭТИОЛИРОВАННЫХ ЛИСТЬЯХ

В результате работ ([1–5]) сложилось мнение, что влияние фитохрома (Ф) на зеленение этиолированных листьев связано с ускорением ресинтеза протохлорофиллида (П). Такое ускорение наблюдалось и у зеленых листьев ([6]). Но в последние годы появились сообщения о независимости ресинтеза П в этиолированных листьях от состояния Ф ([7, 8]). Виргин, ссылаясь только на работы ([7, 8]), в недавнем обзоре ([9]) отдал предпочтение тезису о повышении устойчивости хлорофилла (Х) к фотовыцветанию. С другой стороны, изучение организации процесса формирования Х привело к новой концепции о его осуществлении в особых центрах биосинтеза, в основу которой легли прежде всего два фундаментальных факта: обогащение определенных фрагментов хлоропласта предшественниками и молодыми молекулами X_a и X_b вместе с ферментами заключительных стадий их метаболизма и групповой характер формирования П, X_a и X_b в этиолированных листьях ([10]). Подсказываемое этой концепцией расчленение событий, протекающих внутри центров, и событий, влияющих на возникновение новых центров или сохранение активности существующих, оказалось плодотворным для понимания зависимости различных стадий биосинтеза Х от ингибирования ([11–14]) или стимулирования ([15, 16]) образования РНК и белков как в этиолированных, так и в зеленых листьях. Такой подход был использован и при изучении влияния Ф на метаболизм Х в зеленых листьях ([6]). Казалось полезным применить его и для выяснения противоречий о природе эффекта у этиолированных проростков. Особой задачей являлось изучение влияния Ф на превращение X_a в X_b, ибо было сообщено лишь о том, что активирование Ф приводит к более раннему появлению X_b при повторном освещении ([17]), хотя установлено, что и без этого X_b появляется из возникшего X_a без всякой задержки уже после первого освещения ([18]).

13–14-дневные этиолированные листья кукурузы, выращенные и срезанные даже без слабого зеленого света, освещали 1 мин. белым светом 3000 лк для полного фотовосстановления П и подвергали действию красного (К) или дальнего красного (ДК) света, или К, а затем ДК (через тепловой и интерференционный фильтры с полушириной, интенсивностью и продолжительностью для К 11 ммк, 720 мквт/см^2, 10 мин. и для ДК 9 ммк, 420 мквт/см^2, 25 мин.). Затем их выдерживали 20 час. в темноте и вновь освещали 1 мин. белым светом 1500 лк. Часть листьев сразу фиксировали (2 мин. паром), а часть выдерживали либо повторно в темноте 15 мин., 3 или 6 час., либо 3 часа на свету (1500 лк). Пигменты экстрагировали 80% ацетоном с добавлением аммиака, и по ([19]) определяли сумму протохлорофиллид+протохлорофилл (П), а также X_a вместе с хлорофиллидом (Хд). Затем содержащие фитол и не содержащие его компоненты разделяли по ([20]) и после перевода последних в этиловый эфир определяли содержание Хд по ([21]). Количество X_a находили по разности между первым и вторым определениями. Содержание X_b рассчитывали с учетом этих данных по отношению X_b/X_a, найденному спектрофлуорометрически по ([22]) после очистки фитолизированных компонентов экстракта от каротиноидов хроматографированием в смеси петролейного эфира с ацетоном (93 : 7). Все величины относили к единице сырого веса. Вероятность P случайности отличия отношения рассматриваемых величин между вариантами от единицы оценивали по критерию Стьюдента (ниже она показана в скобках).

Кроме описанной основной схемы, в серии из 6 опытов пробы фиксировали уже через 5 час. первого затемнения, следовавшего непосредственно после действия К на ДК. Отношения содержания пигментов были равны:

	К, ДК/К	ДК/К
$X_a + Xд$	0,99±0,02	0,97±0,04
X_b/X_a	0,99±0,02	0,97±0,03
П	0,99±0,04	0,94±0,04

В этом случае сумма X_a и Хд отражала лишь количество исходного П и, конечно, не зависела от К и ДК. Как известно ([18], [22]), затемнение постэтиолированных растений не препятствует превращению части X_a в X_b, в результате чего отношение X_b/X_a выросло за 5 час. темноты от практически нулевого до 5,5%. Его равенство в разных вариантах означает отсутствие последействия К и ДК на это превращение. Регенерация П достигла почти 90% во всех вариантах.

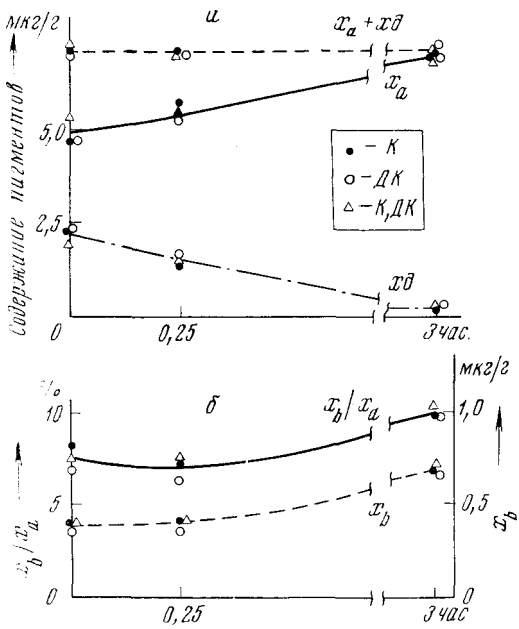

Рис. 1. Влияние длительности повторного затемнения на содержание пигментов (*а*) и отношение количеств хлорофиллов *b*/*a* (в %) в этиолированных листьях кукурузы (*б*), освещенных сначала 1 мин. белым светом, затем обработанных либо К, либо ДК, либо К, а после него ДК светом, выдержанных 20 час. в темноте, опять освещенных 1 мин. белым светом и вновь помещенных в темноту

В соответствии с этим находилось и содержание пигментов сразу после 1 мин. повторного освещения (точки на оси ординат рис. 1). Одинаковая в разных вариантах сумма X_a+Хд подтвердила, что и после 20 час. затемнения не было различий в содержании ресинтезированного П, превращенного при втором освещении. Близким было и содержание X_a и Хд в отдельности, а для вариантов К и ДК каждое из них практически совсем совпало (в отличие от работы ([23])). Только в варианте К, ДК можно предположить несколько большую степень этерификации: отношение К, ДК/К для Хд составило в серии опытов 0,80±0,04, а для X_a 1,14±0,05 (P равны 0,001 и 0,02). Возможно, что большее время освещения в варианте К, ДК (в сумме 35 мин.) действительно оказало ускоряющее влияние, однако состояние Ф как таковое не было при этом существенным. Не исключено также, что эта особенность этерификации в варианте К, ДК, несмотря на, казалось бы, статистическую обоснованность, все-таки была лишь кажущейся. Об этом может говорить отсутствие заметных различий содержания X_a и Хд во время затемнения, особенно показательное при промежуточной глубине этерификации через 15 мин.

Как после первого, так и после второго освещения в темноте продолжается образование X_b из X_a ([18]). При этом ни по абсолютному, ни по относительному (к X_a) содержанию X_b существенных различий между вариантами не наблюдалось (рис. 1). Следовательно, активация или дезактивация Ф не оказали существенного последействия на темновое превращение в X_b ни того X_a, который возник из исходного П этиолированных листьев, ни того, который образовывался из ресинтезированного П. Добавим, что и после 6 час. повторного затемнения также не появилось различий между вариантами по абсолютному или относительному содержанию X_b.

Одновременно с этим последействие активации Ф отчетливо наблюдалось по накоплению П в течение повторного затемнения. Отношения содержания П между вариантами К, ДК/К и ДК/К после повторного затемнения были, безусловно, меньше единицы:

	К, ДК/К	ДК/К
После 3 час.	0,78±0,08 (0,02)	0,58±0,07 (0,001)
После 6 час.	0,71±0,11 (0,08)	0,66±0,04 (0,02)

Разница между этими колонками свидетельствует также о характерном для эффектов Ф обращении действия К при последующем освещении ДК. В разных опытах это обращение составляло 50—85%. В связи с тем, что приведенные величины П получены для суммы содержащего и не содержащего фитол компонентов, отметим, что раздельные определения (проведенные, как описано выше, для X_a и Хд сочетанием измерений по [20] и [21]) указали на проявление последействия Ф и в отношении каждого из них в отдельности. Если ресинтез П после второго освещения действительно зависит от состояния Ф, то указанным различиям накопления П в темноте должны соответствовать различия скорости зеленения на свету. Поэтому в особой серии опытов сравнили содержание X_a и X_b в параллельных пробах, находившихся после второго освещения либо в темноте, либо на свету 1500 лк. Ниже приводятся данные об отношении полученных величин между вариантами К, ДК/К:

	X_a	X_b/X_a	X_b
После 3 час. повторного затемнения	1,01±0,02	1,03±0,02	1,08±0,07
После 3 час. повторного освещения	0,84±0,05 (0,02)	0,84±0,04 (0,005)	0,76±0,09 (0,05)

Видно, что одинаковые в вариантах К и К, ДК количества X_a и X_b наблюдаются только в темноте, освещение же приводит к четкому различию между вариантами, которое означает, что зеленение после активации Ф ускоряется. Содержание X_a и X_b на свету превысило содержание в варианте К в 2.0±0,2 и 2,8±0,4 раза, а в варианте К, ДК в 1,7±0,2 и 1,9±±0,3 раза.

При изучении влияния ингибиторов синтеза РНК мы уже встречались с такой ситуацией, когда реакция превращения X_a в X_b, регистрируемая по накоплению X_b при затемнении постэтиолированных ([14]) или по включению C^{14} в пигменты освещаемых зеленых листьев ([13]), протекала с такой же скоростью, как и в контроле, но накопление обоих пигментов задерживалось. Только поверхностная оценка могла в таком случае привести к кажущемуся заключению о самостоятельной зависимости накопления X_b от изучаемого фактора. В действительности замедленное накопление X_b лишь отражало влияние ингибитора на более ранние стадии биосинтеза, лежащие до формирования X_a, а уже меньшая скорость синтеза этого предшественника X_b приводила к образованию меньшего количества X_b ([14]). Теперь аналогичная картина обнаружилась и в связи с влиянием состояния Ф. По-видимому, в варианте с К, ДК общая скорость зеленения была меньшей, поэтому X_a накапливался медленнее, еще медленнее возникал X_b, и, в соответствии с особенно низким отношением X_b/X_a в начале зеленения, эта величина оказывалась меньшей. Последействие активации Ф на ресинтез П и накопление X_a и X_b наблюдалось несмотря на наличие после К или ДК нового освещения белым светом. Следовательно, это освещение не смогло нивелировать сравниваемые варианты. Возможно, что данного светового потока недостаточно для нейтрализации последействий более ранней обработки или нейтрализация проявилась бы позднее. В последнем случае можно отметить, что, подобно тому как последействие К и ДК проявляется лишь через значительное время, так и нивелирующее влияние белого света сразу не обнаруживается: реакция системы биосинтеза Х наблюдается позднее, чем происходит изменение состояния Ф.

В принципе же второе освещение не является, по-видимому, необходимым для проявления таких эффектов. В нашей работе с зелеными

листьями разное накопление П было обнаружено уже при первом затемнении ([6]). В некоторых случаях это же наблюдалось и у этиолированных листьев ([3–5]). Даже в работе ([8]), послужившей одним из основных поводов для сомнений в стимулировании накопления П при активации Ф, было отмечено, что при равенстве начальных скоростей ресинтеза П после действия К и К, ДК на этиолированные листья кукурузы постепенно появлялось различие содержания пигмента, достигавшее через 24 час у 17-дневных листьев 25%. Хотя результаты этой работы особенно подробно рассматриваются в книге ([24]), все же и там обсуждается лишь равенство начальных скоростей (причем на основе представления об определенном количестве мест регенерации, что соответствует предусматриваемому концепцией центров биосинтеза тезису о равном числе центров), а различие позднее достигаемых уровней опять оставлено без интерпретации.

Между тем, полное объяснение всех накопленных данных дается на основе простого представления, уже высказанного нами ранее ([6]), по которому Ф влияет на события, связанные с возникновением новых центров биосинтеза или с сохранением активности существующих, но не оказывает столь существенного воздействия на события внутри центров. Типичным проявлением событий внутри центра является превращение молекулы X_a в X_b. Выше показано, что оно не зависит от состояния Ф. Что касается образования П, то оно может иметь двойную природу. Во-первых, после фотопревращения П этиолированного листа происходит его повторное накопление прежними центрами биосинтеза, которое также не зависит от Ф. Во-вторых, со временем у листа развивается многосторонняя реакция на состояние, одним из проявлений которой является влияние на число активных центров биосинтеза Х. В этих условиях способность системы центров к накоплению П уже обнаруживает прямую зависимость от Ф. При нашей схеме опытов это наблюдалось после второго освещения, в иных условиях то же может проявляться и просто через какое-то время после первого попадания света, которое инициирует развитие соответствующих механизмов, однако во всех случаях природа явления остается одной и той же. Если вопрос о том, является ли одним из проявлений активации Ф повышение светоустойчивости образующегося Х, еще следует изучить специально, то влияние активации Ф на систему центров биосинтеза Х и, следовательно, П, безусловно, существует. Представляется весьма вероятным, что решающее значение в этой цепи имеет белковый синтез, необходимый и для построения центров биосинтеза Х, и для обновления их элементов ([13]).

Авторы выражают искреннюю признательность А. Б. Рудому за полезное обсуждение постановки опытов и их результатов.

Институт фотобиологии
Академии наук БССР
Минск

Поступило
19 XII 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] *H. I. Virgin,* Physiol. Plant., v. 11, 347 (1958). [2] *E. Augustinussen, A. Madsen,* Physiol. Plant., v. 18, 828 (1965). [3] *E. Rudolph,* Planta, v. 66, 75 (1965). [4] *G. Akoyunoglou,* Physiol. Plant., v. 23, 29 (1970). [5] *M. Masoner, G. Unser, H. Mohr,* Planta, v. 105, 267 (1972). [6] *А. А. Шлык, Г. Е. Савченко и др.,* ДАН, т. 171, 1443 (1966). [7] *R. Jacques,* Physiol. Vég., v. 6, 137 (1968). [8] *C. J. P. Spruit, C. W. Raven,* Acta Bot. Neerl., v. 19, 165 (1970). [9] *H. I. Virgin,* In: Phytochrome, London — N. Y., 1972, p. 371. [10] *A. A. Shlyk, I. V. Prudnikova et al.,* In: Progress in Photosynthesis Research, 1969, p. 572. [11] *А. А. Шлык, Г. Е. Савченко и др.,* ДАН, т. 188, 718 (1969). [12] *А. А. Шлык, Н. Н. Костюк,* ДАН, т. 202, 707 (1972); т. 206, 1002 (1972). [13] *А. А. Шлык, В. И. Гапоненко и др.,* ДАН, т. 207, 1002 (1972). [14] *А. А. Шлык, И. В. Прудникова и др.,* ДАН, т. 208, 472 (1973); т. 211, 744 (1973); т. 214, № 2 (1974). [15] *А. А. Шлык, Г. Вальтер и др.,* ДАН, т. 193, 1429 (1970). [16] *Н. Г. Аверина, А. А. Шлык,* Физиол. раст., т. 19, 487 (1972); т. 20, 725 (1973). [17] *E. Augustinussen,* Physiol. Plant., v. 17, 403 (1964). [18] *A. A. Shluk, A. B. Rudoi, A. Yu. Vesitskii,* Photosynthetica, v. 4, 68 (1970). [19] *J. M. Anderson, N. K. Boardman,* Austr. J. Biol. Sci., v. 17, 93 (1964). [20] *В. Л. Калер, А. А. Шлык,* Биохимия, т. 27, 599 (1962). [21] *V. M. Koski,* Arch. Biochem., v. 29, 339 (1950). [22] *А. Б. Рудой, А. Ю. Везицкий, А. А. Шлык,* ДАН, т. 201, 230 (1971). [23] *C. Liljenberg,* Physiol. Plant., v. 19, 848 (1966). [24] *C. W. Raven,* Chlorophyll Formation and Phytochrome, Wageningen, 1973.