

Б. Н. ИВАНОВ, В. Л. ШМЕЛЕВА, Е. Н. МУЗАФАРОВ, Е. А. АКУЛОВА

**ИЗМЕНЕНИЕ ОТНОШЕНИЙ $P/2e$ И H^+/e^- У ХЛОРОПЛАСТОВ
РАСТЕНИЙ, ВЫРОСШИХ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ
ОСВЕЩЕНИЯ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 22 IV 1974)

Выяснение механизмов приспособительных реакций, позволяющих растениям с максимальной пользой для себя использовать энергию квантов света — одна из важных задач изучения процесса фотосинтеза. В последние годы показано, что у растений, выросших при различной освещенности, изменяется не только соотношение первичных продуктов фотосинтеза (¹), но и скорости некоторых фотохимических реакций изолированных хлоропластов (²) и содержание и активность ряда компонентов электронтранспортной цепи (э.т.ц.) фотосинтеза (³). Логично поэтому предположить, что изменения в темновом метаболизме в зависимости от интенсивности света при выращивании, по крайней мере частично, определяются изменениями в функциональной активности э.т.ц., связанной с запасанием энергии в виде АТФ и НАДФ-Н.

Изучение взаимосвязи транспорта электронов, синтеза АТФ и переноса протонов у изолированных хлоропластов растений, выращенных при разных уровнях освещенности, было целью настоящей работы.

Прямой метод изучения связи электронного переноса и синтеза АТФ заключается в определении отношения $P/2e$ — отношения числа синтезированных молекул АТФ к паре перенесенных по цепи электронов. Однако величина отношения $P/2e$, рассчитанная с учетом полной скорости переноса электрона в фосфорилирующих условиях, вероятно, ниже истинной. По мнению одних авторов, это определяется существованием «базального» транспорта электронов (⁴, ⁵), по мнению других, — наличием в суспензии частично и полностью разобоченных хлоропластов (⁶).

Согласно теории Митчелла, место «энергетического сопряжения» в э.т.ц. митохондрий и хлоропластов соответствует участку, где перенос электрона сопряжен с переносом протона через мембрану. Тогда число протонов, поглощаемых тилакоидами при прохождении одного электрона по э.т.ц. (отношение H^+/e^-), должно быть равно числу мест сопряжения. Знание величин обоих отношений $P/2e$ и H^+/e^- , по-видимому, позволяет более уверенно судить об эффективности запасаения энергии при переносе электрона от воды до НАДФ-Н.

Объектом исследования служили хлоропласты, выделенные из проростков гороха сорта «Неистоцимый», выращенных в термостатированных камерах ($t=20-21^\circ$) при освещении лампами типа ДРЛ или ЛБЖ-80 при интенсивностях света 80 вт/м^2 («световые» растения) и 20 вт/м^2 («теневые» растения). Световой период равнялся 12 час. в сутки. 10—16-дневные проростки срезали в день опыта через 1—2 часа после начала светового периода.

Охлажденные листья размельчали в гомогенизаторе Т-302 в течение 20 сек. в среде, содержащей 0,03 М трис-НСl-буфер, рН 7,4, 0,4 М сахарозу, 10 мМ MgCl₂ и 0,5% бычий сывороточный альбумин. Гомогенат фильтровали через капроновую ткань, фильтрат центрифугировали 3 мин. при 300 g, затем надосадочную жидкость 10 мин. при 1000 g. Хлоропласты ресуспендировались в среде, содержащей 0,4 М сахарозу и 0,5% альбумин;

pH с помощью NaOH доводили до 7,2. Определение содержания хлорофилла проводили по Арнону.

Определение скорости восстановления акцепторов на спектрофотометре «Specord UV VIS» (Карл Цейсс, Иена) проводилось при освещении суспензии с помощью самодельной световой приставки красным светом ($\lambda > 600$ нм) интенсивностью 65 Вт/м². Содержание АТФ в пробах определялось биолюминесцентным методом с регистрацией свечения фотоумножителем.

При определении отношения H^+/e^- в стационарных условиях измерение скорости электронного транспорта и потока протонов осуществлялось по изменению pH среды (⁷⁻⁹). Увеличение скорости ответа измерительной системы достигалось тем, что реакционная смесь объемом 2 мл в термостатированной ячейке имела большую площадь контакта с pH-чувствительной поверхностью стеклянного электрода диаметром 5 мм и интенсивно перемешивалась. Постоянная времени системы была лучше, чем 0,9 сек⁻¹, при стандартных условиях записи кривых. Когда это было необходимо, экспериментальные кривые корректировались согласно (¹⁰).

Константа разложения протонного градиента, K_p , находилась как константа реакции первого порядка, что подтверждалось линейностью зависимости количества вышедших протонов от времени, отложенной в полулогарифмических координатах (⁹). При определении отношения H^+/e^- и поглощения протонов в опытах с ФМС суспензия освещалась красным светом ($\lambda > 600$ нм) интенсивностью 75 Вт/м². Интенсивность красного света ($\lambda > 600$ нм) при определении фотофосфорилирования с ФМС была 80 Вт/м². Указанные в тексте ошибки средних арифметических — это средние квадратичные отклонения.

Для построения калибровочных кривых при измерении скорости восстановления НАДФ⁺ использовался НАДФ-Н фирмы «Reanal», Венгрия. При измерении скорости образования АТФ — препараты АТФ фирм «Calbiochem», США и «Reanal», Венгрия. Ферредоксин выделялся из листьев гороха согласно (¹¹). Валиномицин был любезно предоставлен Институтом химии природных соединений им. М. М. Шемякина.

Таблица 1

Скорости электронного транспорта, фотофосфорилирования и величины отношений P/2e для изолированных хлоропластов растений, выросших при разной интенсивности света

Интенсивность света при выращивании, Вт/м ²	Акцептор	Электронный транспорт *	Синтез АТФ **	P/2e
20	НАДФ ⁺	27	58	2,15
	FeCN	196	140	1,43
80	НАДФ ⁺	65	79	1,21
	FeCN	232	136	1,16

* 1 мкмоль акцептора на 1 мк хлорофилла в час.

** В мкмольях АТФ на 1 мк хлорофилла в час.

Состав реакционной смеси, общим объемом 2 мл: хлоропласты, соответствующие 20 мкг хлорофилла; 50 мМ трис-НСl-буфер (pH 7,8); 5 мМ MgCl₂, 0,5 АДФ; 5 мМ фосфат калия; или 0,5 мМ K₃Fe(CN)₆ или 0,5 мМ НАДФ плюс насыщающее количество ферредоксина гороха (~ 60 мкг).

В табл. 1 и 2 приведены результаты одного из 12 опытов, проведенных с пятью генерациями проростков гороха. Абсолютные величины скоростей фотохимических реакций, а также величины отношений P/2e и H^+/e^- (в отсутствие валиномицина) могли варьировать от опыта к опыту, но соотношение указанных параметров для «световых» и «тенивых» хлоропластов во всех случаях сохранялось. Пределы колебаний отношения P/2e при

восстановлении НАДФ⁺ для «световых» хлоропластов были 0,8–1,3, для «теневого» 1,6–2,6; средние значения равны 1,1±0,17 и 2,02±0,33 соответственно.

Необходимость применения валиномицина для получения истинных значений отношения Н⁺/е⁻ была показана в работе (8). В присутствии этого антибиотика величины отношения Н⁺/е⁻ для «световых» и «теневого» хлоропластов варьировали слабо.

Меньшие, чем при восстановлении НАДФ⁺, различия между величинами отношений Н⁺/е⁻ (в отсутствие валиномицина) и Р/2е для хлоропластов «световых» и «теневого» растений, проявляющиеся при восстановлении феррицианида, а также меньшие абсолютные величины этих отношений могли быть обусловлены взаимодействием полианионов акцептора со структурными и функциональными компонентами мембраны (12). Нельзя при этом исключить возможность восстановления части молекул феррицианида на более коротком участке э.т.д. при отсутствии в суспензии валиномицина.

Полученные данные показывают, что в э.т.д. хлоропластов растений, сформированной в условиях высокой освещенности, имеется два пункта сопряжения переноса электрона и протона. Кроме того, при переносе пары электронов по такой э.т.д. вероятно, синтезируется не более двух молекул АТФ. Отметим, что для «световых» хлоропластов значения отношения Р/2е лежат в пределах обычно сообщаемых в литературе величин (4, 6); отношения Н⁺/е⁻ тоже такие же, как ранее доложенные для данных значений рН (7-9).

Для э.т.д. фотосинтеза, сформированной в условиях низкой освещенности, вероятно характерно наличие трех пунктов сопряжения переноса электрона и протона, а также синтез более двух молекул АТФ при переносе пары электронов от воды до НАДФ-Н. Отметим, что предположение о наличии потенциально трех пунктов транспорта протона, сопряженных с э.т.д. хлоропластов, было недавно выдвинуто на основании теоретических соображений (13).

Полученная в наших экспериментах довольно строгая дискретность отношения Н⁺/е⁻ для «световых» (2±0,1) и «теневого» (3±0,2) хлоропластов, очевидно, есть следствие того, что уровни освещенности растений при выращивании соответствовали началу и плато-зависимости скорости вос-

Т а б л и ц а 2

Константы разложения протонного градиента и величины отношений Н⁺/е⁻ для изолированных хлоропластов растений, выросших при разной интенсивности света

Интенсивность света при выращивании, вт/м ²	Акцептор	К _Т *	К _Т * + валиномицин	Н ⁺ /е ⁻	Н ⁺ /е ⁻ (+ валиномицин)
20	НАДФ ⁺	0,20	0,23	2,6	3
	FeCN	0,07	0,11	1,9	3
80	НАДФ ⁺	0,23	0,24	1,7	2
	FeCN	0,11	0,12	1,6	2

* В сек⁻¹.

Состав реакционной смеси, общим объемом 2 мл: хлоропласты, соответствующие 110 мкг хлорофилла; 5 мМ-трис-НСl-буфер (рН 7,3); 50 мМ KCl; или 0,5 мМ К₃Fe(CN)₆ или 1 мМ НАДФ⁺ + ~120 мкг ферредоксина гороха; 1 мМ валиномицин включался, где указано.

становления НАДФ⁺ от этого фактора (14). Вероятно, при этом суспензии изолированных хлоропластов значительно обогащены органеллами соответствующего функционального типа.

Некоторое отличие соотношения величин Р/2е для «световых» и «теневого» хлоропластов от соотношения величин Н⁺/е⁻ может отчасти определяться более высоким уровнем разобщенности первых. Свидетельством