

УДК 541.144.7+581(132+174)

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Член-корреспондент АН СССР А. А. ШЛЫК, Л. И. ВЛАСЕНОК, Н. И. АХРАМОВИЧ,
С. В. ВРУБЕЛЬ, Е. М. АКУЛОВИЧ

**БИОСИНТЕЗ ХЛОРОФИЛЛА b В ГОМОГЕНАТЕ ЗЕЛЕННЫХ
ЛИСТЬЕВ В ТЕМНОТЕ И НА СВЕТУ**

При исследовании биосинтеза хлорофилла (X) в зеленых листьях установлено, что освещение, необходимое для образования X_a на стадии фотовосстановления протохлорофиллида, не обязательно для превращения X_a в X_b , имеющего ферментативный характер (^{1, 2}). В постэтилированных листьях X_b накапливается некоторый период сходным образом на свету и при повторном затемнении (³⁻⁵). Субстратом для его возникновения является особый подффонд свежееобразованных молекул X_a (⁶⁻⁹). При этом может использоваться даже X_a , введенный извне (¹⁰), или образуемый при инфильтрации хлорофиллида в этилированные листья, остающиеся в темноте (¹¹). Образование X_b наблюдалось в течение нескольких часов затемнения и в гомогенате зеленых листьев (¹²), а также во фракциях фрагментов хлоропластов, особенно в надосадочной жидкости, обогащенной свежееобразованными молекулами X_a (¹⁰). Это означало, что при гомогенизации в существенной степени сохраняются условия, необходимые для превращения части X_a в X_b . Следовало далее проверить, не может ли соответствующий аппарат активироваться светом, важность которого для этой реакции подчеркивалась некоторыми авторами (¹³).

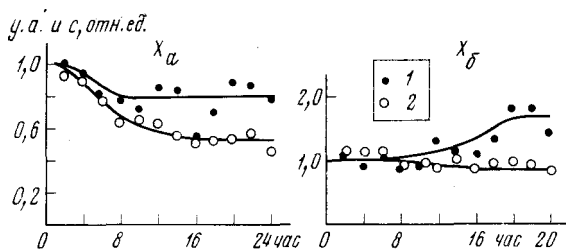


Рис. 1. Кинетика изменения удельной радиоактивности (1) и содержания (2) хлорофиллов а и б в гомогенате ассимилировавших $^{14}\text{CO}_2$ листьев ячменя в течение 24-часовой экспозиции при освещенности $0,4 \text{ вт/м}^2$. Здесь и на рис. 2 все величины отнесены к полученным в контрольной пробе гомогената, фиксированной в момент начала затемнения

7-дневные проростки ячменя, выращенные при 20 вт/м^2 (5000 мл, люминесцентные лампы ЛДЦ-40), экспонировали 5–30 мин. при 4 вт/м^2 в камере с $^{14}\text{CO}_2$. Листья гомогенизировали при 8000 об/мин в течение 1–2 мин. при 3–5° в фосфатном буфере pH 7,2 с 60% сахарозы. Гомогенат фильтровали через 2 слоя капрона, контрольную пробу фиксировали, а остальные выдерживали при встряхивании в темноте или на свету люминесцентных ламп ЛДЦ-40 при освещенности от 0,2 до 67 вт/м^2 при 25°. Пигменты переводили в петролейный эфир и по оптическим плотностям (D) в максимумах поглощения X_a и X_b определяли их количества, используя уравнения Смита и Бенитеза (¹⁴), модифицированные для расчета концентраций (C) в наномолях в 1 мл:

$$C_a = 11,30D_{662} - 1,13D_{664}; \quad C_b = 18,07D_{644} - 2,83D_{662}.$$

Удельные радиоактивности (у.а.) пигментов определяли по (7) после 5-кратного хроматографирования на бумаге.

В первой серии опытов 12 равных частей гомогената экспонировали на свету $0,4 \text{ Вт/м}^2$, периодически фиксируя пробы 4-кратным объемом ацетона. Кинетика изменения содержания X_a и X_b и их у.а. представлена на рис. 1. К концу опыта убыль X_a составила 48%, а X_b 16%. За это время у.а. существенно возросла, достигнув к 20 час. максимального значения. Такой результат напоминает рост у.а.б. при затемнении гомогената, описанный ранее (10, 12). То, что этот рост обусловлен синтезом новых молекул X_b , доказывается увеличением и общей радиоактивности X_b в пробе, достигшим 1,5-кратного. Кроме того, альтернативное объяснение роста у.а.б., которым могло бы быть допущение об избирательной убыли старых, немеченых, молекул, противоречило бы известным фактам: темновое разрушение X_a и X_b касается прежде всего, наоборот, свежесинтезированных молекул (1, 2, 7-9), они же преимущественно разрушаются и при выцветании X_a , тогда как при выцветании X_b избирательности вообще не наблюдалось (15, 16). Следовательно, гомогенат сохраняет способность к образованию новых молекул X_b , причем оно происходило из материала с более высокой у.а., вызывая подъем у.а. в течение опыта. На рис. 1 данные для каждого пигмента нормированы по исходной пробе, абсолютное же значение у.а.а. в ней в 5 раз превышало у.а.б., соответствуя обычным соотношениям (7-10). Кроме того, снижение у.а. свидетельствует о преимущественной убыли молекул из его наиболее меченого подфонда, который, как известно (1, 2, 6-10), и является нормальным предшественником X_b . Пока остается неясным, насколько закономерно то, что избирательная убыль меченых молекул X_a , очень отчетливая на рис. 1 вначале, перестает наблюдаться в течение второй половины опыта.

Таблица 1

Удельные радиоактивности хлорофиллов а и б после 20-часовой экспозиции гомогената ассимилировавших $^{14}\text{CO}_2$ листьев ячменя при разных интенсивностях света (все величины отнесены к полученным после одновременной экспозиции в темноте)

Освещенность, Вт/м^2	Хлорофилл а	Хлорофилл б
0,2	$0,77 \pm 0,03$	$0,97 \pm 0,03$
0,4	$0,86 \pm 0,05$	$1,10 \pm 0,07$
4	$0,85 \pm 0,04$	$0,96 \pm 0,02$
67	$0,86 \pm 0,05$	$0,86 \pm 0,01$

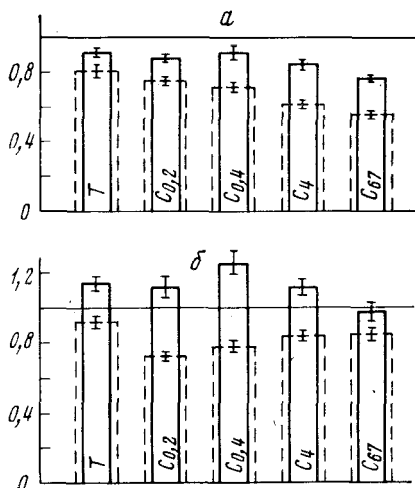


Рис. 2. Содержание хлорофиллов а и б (а) и их удельные радиоактивности (б) после 20-часовой экспозиции гомогената ассимилировавших $^{14}\text{CO}_2$ листьев ячменя в темноте (Т) и на свету различной интенсивности от 0,2 до 67 Вт/м^2 ($C_{0,2}$, $C_{0,4}$, C_4 , C_{67}). Данные для хлорофилла а представлены штриховыми линиями, для хлорофилла б — сплошными

При изучении влияния света различной интенсивности на биосинтез X_b в гомогенате использовали 20-часовую экспозицию в темноте и на свету. Рис. 2 иллюстрирует полученные после этого величины содержания и у.а. обоих X. Видно, что некоторое разрушение пигментных фондов особенно ощутимо для X_a и происходит даже в темноте усиливаясь при высокой освещенности. В соответствии с данными рис. 1 наблюдается также убыль у.а.а., сопровождающаяся ростом у.а.б. (статистически надежным как в темноте, так и на свету). Сравнивая этот рост в разных

вариантах, трудно отметить отчетливую его зависимость от освещенности в диапазоне от 0 до 4 Вт/м². При 0,2 и 4 Вт/м² он численно чуть меньше, по практически не отличается от роста в темноте (табл. 1). Вариант с освещенностью 0,4 Вт/м² мог бы указывать на слабое стимулирование роста у.а._б светом, однако вероятность случайного отклонения величина 1,10±0,07 в табл. 1 от единицы очень велика ($P=0,2$). При прямом сопоставлении с вариантом 0,2 Вт/м² у.а._б при 0,4 Вт/м² оказалась в среднем на 6% больше, однако опять-таки статистически ненадежно ($P=0,08$). Таким образом, если свет и стимулирует биосинтез X_b при освещенности 0,4 Вт/м², то лишь в очень небольшой степени, препятствующей уверенной констатации эффекта. В пользу его случайного происхождения свидетельствуют и результаты проверки, проведенной при 1 Вт/м²: в этом случае у.а._б выросла за время экспозиции на те же 12%, что и в темноте или при 0,2 и 4 Вт/м². Что же касается высокой освещенности, то при 67 Вт/м² роста у.а. вообще не было (рис. 1), и в этом случае мы имеем дело с явным ингибированием. Его природа и возможная связь с выцветанием лабильных молекул X_a требуют специального выяснения.

Ранее уже было показано, что накопление X_b в постэтиолированных листьях также непосредственно не зависит от освещенности, лишь опосредованно отражая влияние света на образование и сохранение лабильных молекул X_a (⁵).

Проведенные исследования подтвердили полученные ранее результаты, свидетельствующие о темновом характере биосинтеза X_b из X_a , и показали, что протекание этого процесса в гомогенате зеленых листьев ячменя заметно не стимулируется светом испытанных интенсивностей.

Институт фотобиологии
Академии наук БССР
Минск

Поступило
23 I 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Шлык, Е. М. Станишевская, ДАН, т. 143, 226 (1962). ² А. А. Шлык, Г. А. Ветохина, ДАН, т. 150, 924 (1963). ³ А. Б. Рудой, А. А. Шлык, А. Ю. Везицкий, ДАН, т. 183, 215 (1968). ⁴ А. А. Shlyk, A. B. Rudoi, A. Yu. Vesitskii, Photosynthetica, v. 4, 68 (1970). ⁵ А. А. Shlyk, A. B. Rudoi, A. Y. Vesitsky, In: Proc. II Intern. Congress on Photosynthesis Research, v. 3, The Hague, 1972, p. 2289. ⁶ А. А. Шлык, Л. И. Фрадкин, Биофизика, т. 6, 424 (1961); т. 7, 281 (1962). ⁷ А. А. Шлык, Метаболизм хлорофилла в зеленом растении, Минск, 1965. ⁸ А. А. Shlyk, In: Annual Review of Plant Physiology, v. 22, 169 (1971). ⁹ А. А. Шлык, В сб.: Проблемы биосинтеза хлорофиллов, Минск, 1971, стр. 53. ¹⁰ А. А. Shlyk, L. V. Prudnikova, Photosynthetica, v. 1, 157 (1967). ¹¹ А. Б. Рудой, А. Ю. Везицкий, В сб.: Итоги исследований по Международной биологической программе в Белорусской ССР, Минск, 1974, стр. 78. ¹² А. А. Шлык, И. В. Прудникова, ДАН, т. 160, 720 (1965). ¹³ S. W. Thorne, N. K. Boardman, Plant Physiology, v. 47, 252 (1971). ¹⁴ J. H. C. Smith, A. Benitez, In: Modern Methods of Plant Analysis, v. 4, Berlin, 1955, p. 142. ¹⁵ А. А. Шлык, В. И. Гапоненко и др., ДАН, т. 188, 1189 (1969). ¹⁶ А. А. Шлык, В. И. Гапоненко и др., В сб.: Биохимия, в. 1, Минск, 1973, стр. 168.