

К. Я. БИЛЬ, В. В. КЛИМОВ, Н. В. КАРАПЕТЯН, Ю. С. КАРПИЛОВ

АКТИВНОСТЬ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДВУХ ФОТОСИСТЕМ В ХЛОРОПЛАСТАХ ПАРЕНХИМНЫХ ОБКЛАДК СОСУДИСТЫХ ПУЧКОВ ЛИСТЬЕВ КУКУРУЗЫ

(Представлено академиком А. И. Опариным 13 III 1975)

При фотосинтезе кукурузы две ассимиляционные ткани в листьях кооперативно осуществляют реакции фиксации и восстановления углекислоты. Цикл С-4-дикарбоновых кислот, функционирующий дополнительно к восстановительному пентозофосфатному циклу, позволяет переносить из мезофильной ткани в клетки паренхимных обкладок сосудистых пучков (к.п.о.) не только углекислоту, но и восстановитель (¹, ³). У кукурузы и подобных ей С-4-растений «малатного» типа ламеллярные хлоропласты к.п.о. содержат высокоактивный «малик»-энзим, который восстанавливает НАДФ при декарбоксилировании поступающей из клеток мезофилла яблочной кислоты (², ³).

На основании особенностей углеродного метаболизма и ультраструктуры хлоропластов к.п.о. листьев кукурузы сформулирована (¹) гипотеза, предполагающая их специализацию к циклическому фотофосфорилированию и редукцию в ламеллярных пластидах фотосистемы 2 (ФС-2).

Действительно, последующие исследования (⁴⁻⁸) показали, что по пигментному составу, отношению $P_{700}/\text{хлорофилл}$, спектрам поглощения и флуоресценции ламеллярные хлоропласты к.п.о. значительно отличаются от гранальных мезофильных и сходны с фрагментами, обогащенными фотосистемой 1 (ФС-1). Активность реакции Хилла и нециклического фотофосфорилирования у хлоропластов к.п.о. листьев кукурузы на единицу хлорофилла в различных исследованиях составляла от 0 до 50% (⁵⁻⁸), а в опытах Смайли и сотрудников (⁹), при высокой интенсивности света и добавлении пластоцианина, хлоропласты восстанавливали НАДФ, используя в качестве донора электронов воду, с такой же скоростью, как и мезофильные пластиды.

Для объяснения описанных выше результатов можно было предположить следующее: 1) низкая активность реакции Хилла в опытах (⁵⁻⁷), проведенных на фрагментах хлоропластов к.п.о., является результатом потери ими пластоцианина и других компонентов электротранспортной цепи (э.т.ц.); 2) ламеллярные пластиды к.п.о. в условиях высокой интенсивности света и при добавлении экзогенного пластоцианина (⁸) были способны к альтернативному пути нециклического электронного транспорта, не функционирующему в физиологических условиях; 3) различные уровни нециклического электронного потока и реакции Хилла в опытах (⁵⁻⁹) объясняются неполной очисткой хлоропластов к.п.о. от мезофильных пластид при разделении ассимиляционных тканей механическим разрушением.

Для проверки высказанных предположений в настоящей работе получено полное разделение клеток мезофилла и паренхимных обкладок зрелых листьев трехнедельных растений кукурузы, выращенных при оптимальных условиях в фитотронной камере. Оно достигалось обработкой высечек

листьев целлюлазой по методу (¹⁰). Использование в части анализов протопластов клеток мезофилла и к.п.о. (рис. 1), где хлоропласты были интактными, предотвращало возможность потери компонентов э.т.д. Опыты проведены при высокой интенсивности света ($4,9 \cdot 10^5$ эрг/см²·сек) и включали вариант с добавкой экзогенного пластоцианина.

В качестве теста на активность реакции Хилла, который может применяться при различной степени дезинтеграции листа и хлоропласта, использовали гистохимический метод (¹¹). Как и в ранее описанных опытах (⁴), светопроиндуцированное восстановление тетразолия до кристаллов формазана, подавляющееся диуроном, наблюдали на срезах листьев только в клетках

Таблица 1

Восстановление тетразолия на свету в хлоропластах мезофилла и паренхимных обкладок сосудистых пучков листьев кукурузы

Объекты	Ткани	Инкубационные среды			
		ТНТС	ТНТС+ДУ	ТНТС+ПЦ	ТНТС+ +ДХФИФ+ +аскорбат натрия
Лист	М	+	—	+	+
	О	—	—	—	+
Изолированные протопласты и клетки	М	+	—	+	+
	О	—	—	—	+
Фрагменты хлоропластов	М	+	—	+	+
	О	—	—	—	+

Примечание. М — мезофилл, О — обкладка, ТНТС — смесь растворов тетранитротетразолия синего (1 мг на 1 мл), $\frac{1}{10}$ М фосфатного буфера pH 6,5—7,0 и $\frac{1}{2}$ М сахарозы в соотношении 3:1:3; ДУ — диурон 10^{-5} М; ПЦ — пластоцианин 0,5 мг/мл; ДХФИФ — 2,6-дихлорфенолиндофенол. Время темновой инкубации 0,3—2 часа. Срезы листьев дополнительно перед инкубацией инфильтровали в том же растворе. Знак «плюс» означает наличие реакции, знак «минус» — отсутствие реакции.

мезофилла. Аналогичная реакция отмечалась в изолированных протопластах мезофильных клеток и в выделенных из них фрагментах хлоропластов (табл. 1). Интактные хлоропласты к.п.о. и их фрагменты восстанавливали тетразолий только при добавлении электронодонорной пары независимо от присутствия в среде пластоцианина. Это соответствует данным (⁴⁻⁷) о высокой активности у них ФС-1 и недостаточности ФС-2.

Активность реакции Хилла хлоропластов, выделенных из энзиматически очищенных к.п.о., при использовании феррицианида в качестве акцептора электронов была близка к нулю и не повышалась при добавлении пластоцианина. Дополнительно для характеристики нециклического электронного потока, функционирования центров ФС-2 и ее сопряжения с ФС-1 изучали способность хлоропластов к изменениям выхода флуоресценции хлорофилла (ДФ), индуцируемых светом.

Кинетику фотоиндуцированных ДФ измеряли на установке, описанной ранее (¹²). Монохроматический измерительный свет слабой интенсивности (480 нм, 10 эрг/см²·сек) возбуждал флуоресценцию объекта, выход которой изменялся под действием дополнительного интенсивного освещения. В качестве действующего света использовали свет 600—700 нм ($1,5 \cdot 10^5$ эрг/см²·сек), который возбуждает главным образом ФС-2 (свет 2), и свет $\lambda > 710$ нм, $1,7 \cdot 10^6$ эрг/см²·сек, возбуждающий преимущественно ФС-1 (свет 1). Регистрировали флуоресценцию с $\lambda > 660$ нм. Величина ДФ характеризует способность активных центров ФС-2 к обратимым фотопревращениям, а уменьшение выхода флуоресценции ФС-2 при возбуждении ФС-1 может служить показателем взаимодействия фотосистем через цепь переноса электрона (¹³⁻¹⁵).

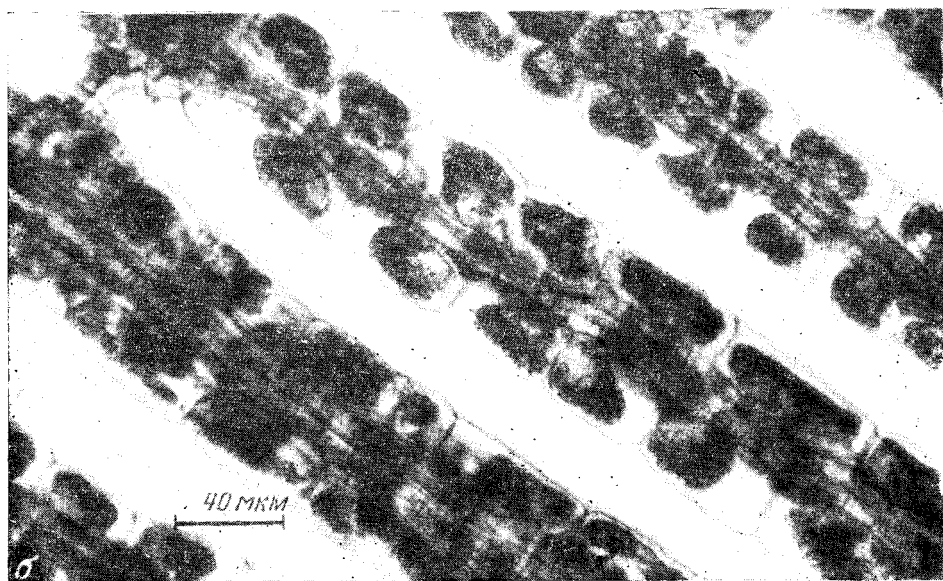
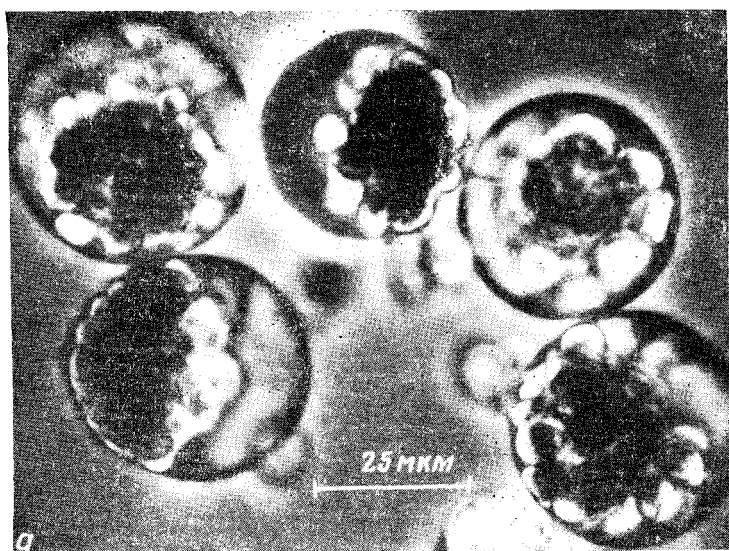


Рис. 1. Протопласты клеток мезофилла (а) и клетки паренхимной обкладки, окружающие сосудистый пучок (б), выделенные из листьев кукурузы энзиматической обработкой (целлюлоза 2%, сорбитол 0,6 М, $MgCl_2$ 0,005 М, буфер HEPES pH 5,5)

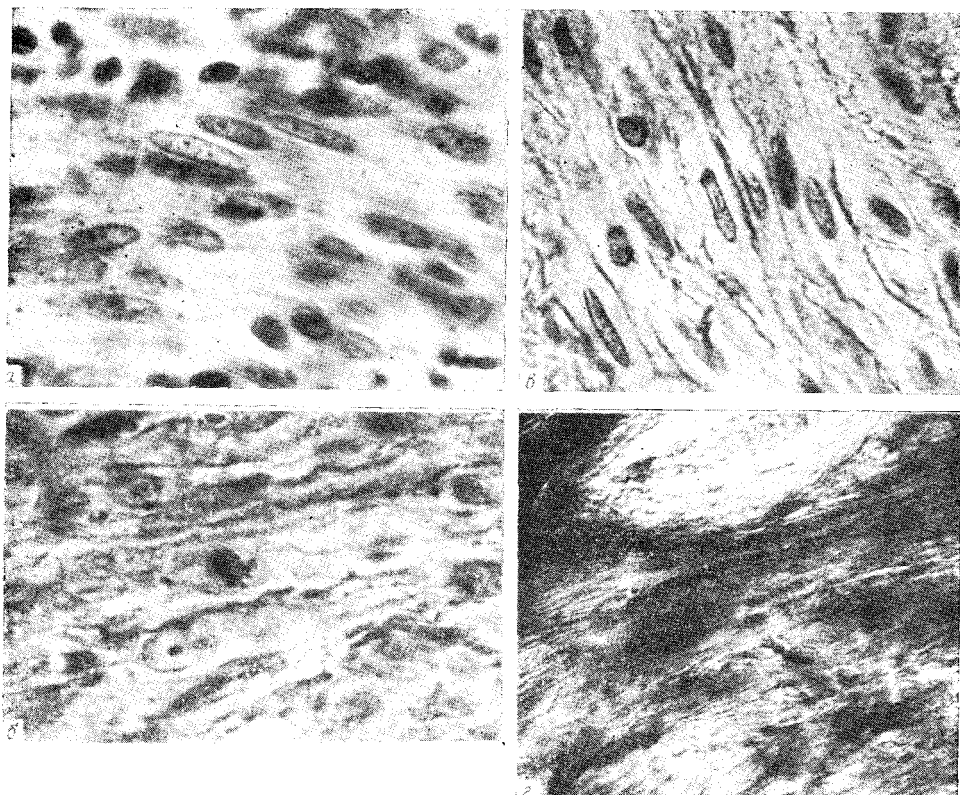


Рис. 1. Хронологически последовательный процесс новообразования мышечной ткани сердца у крыс после повреждения миокарда и лечения препаратом «Со-35». *а* — группы миобластов в поврежденной зоне через 7 дней после коагуляции миокарда. Гематоксин — эозин, об. 90×, ок. 10×. *б* — мiosимпласмы в зоне повреждения миокарда через 13 дней после коагуляции мышцы сердца. Гематоксин — эозин, об. 90×, ок. 10×. *в* — недифференцированный миосинцитий в области повреждения мышцы сердца через 35 дней после коагуляции. Железный гематоксин с докраской пикрофуксином, об. 90×, ок. 7×. *г* — дифференцированный миосинцитий, лежащий рядом с нормальной новообразованной артерией среди соединительной ткани, замещающей очаг повреждения миокарда через 140 дней опыта. Железный гематоксин с докраской пикрофуксином, об. 40×, ок. 10×

При освещении светом 2 суспензии протопластов мезофилла или к.п.о. наблюдается увеличение выхода флуоресценции хлорофилла, обратимое в темноте (рис. 2). Отношение величины этих ΔF к «темновой» (постоянной) флуоресценции (F) составляет для протопластов мезофилла 1,4, для выделенных механическим разрушением листьев к.п.о. 0,5 и только 0,05 — для к.п.о., изолированных энзиматическим методом. Низкое отношение $\Delta F/F$ в последнем варианте не связано с влиянием раствора целлюлазы, использовавшейся для выделения к.п.о., так как хлоропласты в полученных обработкой этим ферментом протопластах мезофильных клеток сохраняли характерное для них высокое значение ΔF . При высокой активности ФС-2 у мезофильных хлоропластов даже небольшое загрязнение ими может существенно влиять на показатели фракции пластид к.п.о.

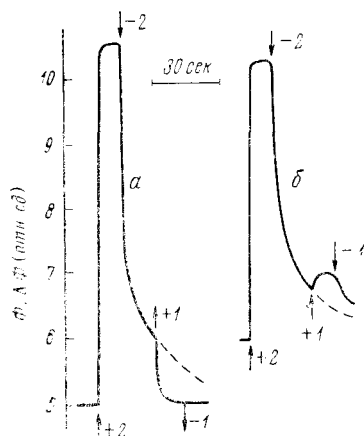


Рис. 2

Рис. 2. Кинетика фотоиндуцированных ΔF протопластов мезофилла. *a* — без добавок, *b* — в присутствии $2 \cdot 10^{-5}$ *M* диурана. Условные обозначения: стрелка вверх — включение; стрелка вниз — выключение действующего света 2 (+2; -2) или света 1 (+1; -1). $D_{880}=1$

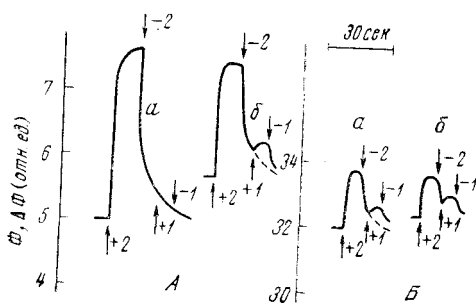


Рис. 3

Рис. 3. Кинетика фотоиндуцированных ΔF к.п.о., выделенных механическим разрушением листьев (*A*) и энзиматическим методом (*B*). Коэффициент усиления прибора для измерений на рис. *B* в 6 раз больше, чем на рис. *A* и рис. 2. Остальные обозначения — как на рис. 2

Темновой спад сигнала фотоиндуцированных ΔF у протопластов мезофилла резко ускорился при включении действующего света 1 (рис. 2*a*). Этот эффект не проявлялся при добавлении к протопластам диурана, блокирующего перенос электронов между фотосистемами (рис. 2*б*), а также у к.п.о., выделенных энзиматическим методом, как до, так и после обработки диураном (рис. 3*Б*). Изменение темнового спада переменной флуоресценции под действием света 1 у к.п.о., выделенных механическим разрушением листьев (рис. 3*А*), выражалось кривой, имеющей промежуточную форму между двумя вышеописанными вариантами (рис. 2*a*, 3*Б*), которая могла быть результатом наложения ΔF обкладочных и загрязняющих их мезофильных хлоропластов.

Эффект фотоиндуцированного уменьшения флуоресценции ФС-2 связан с окислением фотосистемой 1 восстановленных продуктов фотореакции 2 (¹³, ¹⁴). Отсутствие его у полностью очищенных к.п.о. может свидетельствовать о нарушении в их хлоропластах взаимодействия двух фотосистем через цепь переноса электрона.

Фотоиндуцированные изменения выхода флуоресценции хлоропластов мезофилла типичны для ΔF ФС-2. Темновой спад этих ΔF замедляется под влиянием восстановленного ДХФИФ и диурана (рис. 4*a*), что согласуется

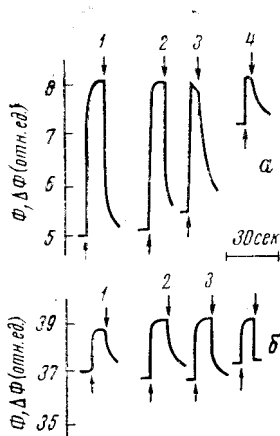


Рис. 4. Кинетика ΔF хлоропластов мезофилла (а) и к.п.о. (б) при освещении светом 2 без добавок (1) и при последовательном добавлении 10^{-3} М аскорбата натрия (2), $2 \cdot 10^{-5}$ М ДХФИФ (3), $2 \cdot 10^{-5}$ М диурона (4). Содержание хлорофилла 0,01 мг/мл. Коэффициент усиления прибора для измерений на рис. б в 8 раз больше, чем на рис. а

с представлениями об их связи с фотовосстановлением акцептора электрона ФС-2 (¹³⁻¹⁵). Фотоиндуцированные ΔF хлоропластов к.п.о. по своим свойствам близки к ΔF , описанным ранее (¹⁵) у легких фрагментов, обогащенных ФС-1: при последовательном добавлении аскорбата натрия и ДХФИФ отмечалось ускорение темнового спада ΔF (рис. 4б). Эта компонента ΔF , сохраняющаяся в присутствии диурона, может быть связана с увеличением выхода флуоресценции ФС-1 вследствие фотоокисления P_{700} (¹⁵). У хлоропластов к.п.о. она составляет $2/3$ от общей ΔF (рис. 4б). Следовательно, только около $1/3$ ΔF к.п.о. может быть приписано ФС-2. Исходя из этого и используя значения ΔF хлоропластов мезофилла и к.п.о. (рис. 4), можно рассчитать, что содержание способных к фотопревращениям активных центров ФС-2 на молекулу хлорофилла в полностью очищенных хлоропластах к.п.о. примерно в 50 раз меньше, чем в пластидах мезофилла. При такой недостаточности активных центров ФС-2 и нарушенном сопряжении ее с ФС-1 ламеллярные хлоропласты к.п.о. листьев кукурузы не могут принимать существенного участия в фоторазложении воды и обеспечении восстановителем локализованного в них пентозофосфатного цикла фотосинтеза.

Авторы признательны Р. Г. Бутенко за консультации по использованным методам, Л. К. Белобородской — за техническую помощь и В. К. Гинс — за предоставленный препарат пластоцианина.

Институт фотосинтеза
Академии наук СССР
Пушино-на-Оке

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
11 III 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Ю. С. Карпилов, Тр. Молдавск. н.-и. ин-та орошаемого земледелия и овощеводства, т. 11, спец. вып. 3, Кишинев, 1969. ² Ю. С. Карпилов, О. Г. Малышев и др., В сб. Фотосинтез кукурузы. Особенности структуры и функций фотосинтетического аппарата, Пушино, 1974, стр. 89. ³ C. C. Black, jr., Ann. Rev. Plant. Physiol., v. 24, 253 (1973). ⁴ Ю. С. Карпилов, К. Я. Буль и др., ДАН, т. 197, 2, 480 (1974). ⁵ K. C. Woo, J. M. Anderson et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 67, 1, 18 (1970). ⁶ J. M. Anderson, N. K. Boardman, D. Spenser, Biochim. et biophys. acta, v. 245, 2, 253 (1971). ⁷ J. M. Anderson, K. S. Woo, N. K. Boardman, Biochim. et biophys. acta, v. 245, 2, 398 (1971). ⁸ B. M. Govindjee, Plant Physiol., v. 48, 1, 189 (1971). ⁹ R. M. Smillie, K. S. Anderson et al., Plant Physiol., v. 49, 4, 471 (1972). ¹⁰ R. Kanai, G. E. Edwards, Plant Physiol., v. 51, 6, 1133 (1973). ¹¹ Ю. С. Карпилов, К. Я. Буль, В сб. Методы изучения электрон-транспортной цепи хлоропластов, Пушино, 1974, стр. 87. ¹² Н. В. Карапетян, В. В. Климов, Физиол. раст., т. 18, 1, 223 (1971). ¹³ L. N. M. Duysens, H. E. Sweers, In: Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria, J. Ashida (Ed.), Tokyo, 1963, p. 353. ¹⁴ В. В. Климов, Ф. Ланг и др., Физиол. раст., т. 19, 1, 151 (1972). ¹⁵ N. V. Karapetyan, V. V. Klimov, A. A. Krasnovsky, Photosynthetica, v. 7, 4, 330 (1973).