Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ВОПРОСЫ ВЗАИМОСВЯЗИ ФОТОСИНТЕЗА И ДЫХАНИЯ

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
БИОЛОГИИ И БИОФИЗИКИ ПРИ ТОМСКОМ
ГОСУДАРСТВЕННОМ УНИВЕРСИТЕТЕ

ВОПРОСЫ ВЗАИМОСВЯЗИ ФОТОСИНТЕЗА И ДЫХАНИЯ

1-68305

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА ТГУ
ДЛЯ КНИГ

ИЗДАТЕЛЬСТВО ТОМСКОГО УНИВЕРСИТЕТА
Томск — 1988

581.12 + 581.132

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. /Под ред. В. Л. Вознесенского. — Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988. — 248 с. — 1 р. 90 к. 500 экз.

В сборнике представлены обзорные материалы и новые экспериментальные данные, доложенные на Всесоюзном совещании по взаимосвязи дыхания и фотосинтеза в ассимилирующих клетках и органах. Обсуждаются проблемы действия света на отдельные этапы темнового дыхания, связи их с реакциями фотосинтеза и фотодыхания, изменения дыхательных и фотосинтетических процессов под влиянием факторов внешней среды.

Для физиологов растений, биохимиков, преподавателей, аспирантов и студентов биологических специальностей.

Редакционная коллегия:
д-р биол. наук В. Л. Вознесенский (ответ. редактор), канд. биол. наук Г. С. Верхотурова (зам. ответ. редактора), канд. биол. наук Н. С. Мамушина, канд. биол. наук Л. А. Филиппова, канд. биол. наук Т. П. Астафурова.

Рецензент — доктор биологических наук Т. В. Чиркова

В $\frac{2001040000}{177\ (012)-88}$ 75—88

© Издательство Томского университета, 1988

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ПРЕДИСЛОВИЕ

В настоящее время назрела необходимость решения конкретных вопросов в биологической науке, в частности в области повышения продуктивности растений. Большую роль в этом должна сыграть физиология растений, особенно те ее разделы, которые познают процессы фотосинтеза и дыхания растений, их взаимодействия между собой, роста растений и транспорта ассимилятов. Чтобы понять причины образования растением той или иной биомассы, необходимо исследовать не столько конечный результат (продуктивность), сколько ход продукционного процесса. При этом одним из наименее изученных вопросов до сих пор остается взаимовлияние фотосинтеза и дыхания.

Фотосинтез является поставщиком ассимилятов, из которых строится биомасса. Энергию же для сложных синтезов при построении биомассы в основном поставляет дыхание — процесс, при котором тратятся ассимиляты. Однако в последнее время возникли представления о возможном обеспечении энергией части биосинтезов непосредственно фотосинтезом. Теоретически такая возможность может привести к значительному выигрышу (до 30%) в накоплении биомассы. Поэтому одной из основных проблем физиологии растений является проблема взаимоотношений фотосинтеза и дыхания в продукционном процессе. Исследования в этом направлении требуют экспериментов на разных уровнях организации растения.

В сборнике представлены материалы экспериментальных исследований, посвященных изучению взаимосвязи фотосинтеза и дыхания в ассимилирующих клетках и органах растений.

В ряде работ с точки зрения современных представлений рассматриваются вопросы о функционировании на свету отдельных этапов темнового дыхания: гликолиза, окислительно-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

го пентозофосфатного пути и цикла Кребса в ассимилирующих прокариотических и эукариотических клетках. Особое внимание обращается на проблемы, связанные с регуляцией этих этапов темнового дыхания метаболитами, энергетическими и восстановительными эквивалентами, возникающими на свету в процессе фотосинтеза. Представлен материал о хлоропластно-митохондриальных взаимодействиях in vitro, дающий информацию о возможных внутриклеточных взаимосвязях, о соотношении фотосинтеза, темнового дыхания и фотодыхания в фотосинтезирующих клетках. Целый ряд работ посвящен действию разнообразных факторов среды (спектральный состав света, температура, гипоксия и др.), а также эндогенных факторов (гормоны) на фотосинтез, дыхание и рост.

Доктор биол. наук | *В. Л. Вознесенский* |

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

О ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ГЛИКОЛИЗА И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО ЦИКЛА В АССИМИЛИРУЮЩЕЙ КЛЕТКЕ НА СВЕТУ И В ТЕМНОТЕ

Н. С. Мамушина, Л. А. Филиппова, Е. К. Зубкова

Ботанический институт АН СССР

Первым этапом гликолитического пути дыхания, как известно, является гликолиз, т. е. окисление глюкозы до пирувата. Параллельно с гликолизом происходит окисление глюкозы через окислительный пентозофосфатный цикл (ОПФЦ).

Последовательность реакций и многие детали их протекания для обоих циклов хорошо изучены на животных объектах. Экспериментальные подходы, использованные биохимиками животных, в значительной степени повторяют и исследователи гликолиза и ОПФЦ растительных объектов. Специфика функционирования этих процессов в клетках листа растений состоит в том, что на свету одновременно с процессами окисления происходит противоположно направленная цепь реакций фотосинтетического образования глюкозы.

До середины 60-х гг. в литературе господствовало представление, что в растительной клетке оба пути окисления глюкозы функционируют в цитоплазме. Однако позднее (60—70-е гг.) было обнаружено, что и гликолиз, и ОПФЦ локализованы не только в цитоплазме, но и в хлоропластах ассимилирующих клеток.

Цель настоящего обзора — систематизировать имеющиеся в литературе и полученные нами данные о функционировании гликолиза и ОПФЦ в автотрофных клетках, т. е. о возможностях протекания реакций окисления глюкозы на свету в условиях, оптимальных для фотосинтеза, когда одновременно идет синтез углеводов — крахмала и сахарозы.

Исследования гликолиза и ОПФЦ проводят путем изучения метаболизма, локализации ключевых ферментов в различных компартментах клетки и определения их активности. Ключевые ферменты ОПФЦ— глюкозо-6-фосфат-и 6-фосфоглюконатдегидрогеназа — впервые были найдены в хлоропластах шпината Хебером в 1967 г. [1]. Затем наличие двух форм

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

(хлоропластной и цитоплазматической) ключевых ферментов ОПФЦ было показано на листьях гороха [2] и клетках хлореллы [3].

Что касается локализации в хлоропластах гликолиза, то свидетельствующая об этом первая работа Латцко появляется в 1975 г. [4]. Затем публикуется цикл его работ, посвященных исследованию ключевого фермента гликолиза (фосфофруктокиназы хлоропластов шпината) и сравнению его свойств с цитоплазматической формой [5]. Почти одновременно появляются доказательства (на уровне метаболизма) функционирования гликолиза в хлоропластах, который наряду с ОПФЦ участвует в темноте в процессе окисления глюкозы, образующейся при распаде крахмала [6]. При этом было высказано предположение, что окисление глюкозы по гликолитическому пути идет до 3-ФГК, которая затем транспортируется из хлоропласта в цитоплазму [7]. Однако, по данным других авторов, в хлоропластах C_3-растений обнаружены и такие ферменты гликолиза, как фосфоглицератмутаза, энолаза и пируваткиназа, т. е. допускается возможность функционирования в хлоропластах и конечного этапа гликолиза — от 3-ФГК до пирувата [8, 9, 10, 11, 12].

Прежде всего разберем, как разные метаболитические пути окисления глюкозы (гликолиз и ОПФЦ) регулируются в хлоропласте на свету. Из-за общности локализации ферментов распада и синтеза углеводов в пределах стромы хлоропласта должен быть механизм селективной регуляции этих ферментов на свету и в темноте, который поддерживал бы непрерывность в снабжении хлоропласта и клетки энергией и метаболитами, так как в пределах этой органеллы при переходе от темноты к свету происходит смена гетеротрофного типа метаболизма (темнота) на автотрофный. Существует несколько путей этой динамической и избирательной регуляции [13].

1. На свету в хлоропласте, благодаря работе электронтранспортной цепи, происходит повышение уровня АТФ и $НАДФН_2$, что может регулировать работу целого ряда ферментов.

Действительно, как оно было показано в опытах in vitro, увеличение отношения $НАДФН_2$/НАДФ и повышение концентрации рибулозодифосфата ингибируют ключевой фермент ОПФЦ — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу [14]. Кроме того, исследование включения ^{14}C и ^{32}P в клетках хлореллы и хлоропластах шпината на свету в условиях протекания фотосин-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

теза показало, что метка в 6-фосфоглюконате (маркер ОПФЦ) не появляется. Однако при ингибировании фотосинтеза витамином K_5 ^{14}C включается в этот метаболит ОПФЦ [15].

Повышение уровня АТФ на свету может вызывать аллостерическое ингибирование ключевого фермента гликолиза — фосфофруктокиназы, а увеличение отношения АТФ/НАДФH_2 может инактивировать по принципу обратной связи другой фермент гликолиза — НАДН-глицеральдегидфосфатдегидрогеназу [16].

2. На свету в хлоропласте происходят сдвиги в концентрации ионов H^+, Mq^{2+}, которые также могут дезактивировать работу ферментов окисления и стимулировать ряд ключевых ферментов цикла Кальвина и синтеза крахмала. Было установлено, что увеличение pH до 8 в строме хлоропласта, уменьшение концентрации $P_н$, увеличение концентрации ФГК и фосфогликолата ингибируют фосфофруктокиназу и стимулируют АДФГ — пирофосфорилазу, ответственную за синтез крахмала на свету. Автор обращает внимание на то, что одни и те же факторы участвуют в регуляции двух ключевых ферментов синтеза и окисления углеводов, но на свету и в темноте работают с обратным знаком [5].

3. По данным Бьюкенена [19], ферменты начального этапа распада крахмала (фосфорилаза, фосфоглюкомутаза и глюкозо-1-фосфатизомераза) ингибируются на свету с помощью реакций, чувствительных к ДСМИ, т. е. связанных с работой II фотосистемы. Может быть, этот ингибирующий эффект обусловлен появлением восстановленного тиоредоксина или другого регуляторного белка в восстановленной форме (LEM), которые в то же время на свету активируют дефосфорилирующие ферменты цикла Кальвина — бисфосфатазы [19, 20].

В целом факты, полученные к настоящему времени при исследовании ферментов и метаболизма углерода, позволяют говорить о практически полном ингибировании ОПФЦ в хлоропластах на свету в условиях, оптимальных для фотосинтеза. Что касается того, полностью ли ингибирован гликолиз в хлоропластах на свету, то этот вопрос еще окончательно не выяснен. Так, на хлоропластах шпината было показано, что распад крахмала на свету происходит со скоростью 2 атома С · мг. хлорофилла/ч, что в 5 раз ниже, чем в темноте. Окисление образовавшейся при этом глюкозы идет по гликолитическому пути [21]. Это позволяет говорить только об ограни-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

чении работы гликолиза в хлоропластах на свету, а не о полном его ингибировании [21].

Теперь разберем, как функционируют оба пути окисления глюкозы в цитоплазме, каковы механизмы их регуляции на свету в условиях, оптимальных для фотосинтеза, когда одновременно в этом компартменте клетки идет синтез сахарозы. Данных, касающихся работы ОПФЦ в цитоплазме на свету, очень мало. Так, in vitro показано, что цитоплазматическая форма глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы на 40—60% снижает свою активность в листьях шпината и гороха, выдержанных на свету. Предполагают, что механизмом ингибирования этого фермента на свету является так же, как и для хлоропластной формы, увеличение отношения НАДФH_2/НАДФ [14, 22]. Таким образом, можно полагать, что работа ОПФЦ в цитоплазме на свету также ограничена.

Рассмотрим, как работает гликолитический путь окисления глюкозы в цитоплазме на свету. В 60-х годах в лабораториях Кандлера и Хебера было показано, что на свету ингибируется центральный этап гликолиза: сопряженное с образованием АТФ и НАДH_2 окисление ФГА до ФГК [23, 24].

Более длительное исследование реакций гликолиза на свету с помощью экзогенной глюкозы-^{14}C было выполнено на водорослях [25, 26], протопластах [27, 28] и листьях C_3 и C_4 растений [29, 30]. Авторы наблюдали, что введенная глюкоза метаболизировалась по гликолитическому пути и в цикле Кребса. В некоторых работах отмечено уменьшение выделения $^{14}CO_2$ на свету по сравнению с темнотой. Это можно интерпретировать или как результат реассимиляции CO_2, или как ингибирование какого-то этапа гликолитического пути дыхания на свету. Для выяснения этого вопроса мы провели на стерильной культуре хлореллы исследования гликолиза и цикла Кребса (с помощью глюкозы-^{14}C и малата-^{14}C) на свету и в темноте при 2% CO_2 и большой скорости тока воздуха, что давало возможность снизить реассимиляцию CO_2 примерно до 10% [31]. Результаты этих опытов показали, что выделение $^{14}CO_2$ при окислении меченой глюкозы на свету меньше, чем в темноте (рис. 1).

Окисление малата-^{14}C идет с одинаковой скоростью на свету и в темноте. Это свидетельствует о том, что цикл Кребса на свету в клетках хлореллы не ингибирован, а реассимиляция в условиях высокой концентрации CO_2 на свету действительно невелика. Таким образом, полученные нами данные позволили сделать заключение, что в клетках хлореллы на све-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ту в условиях интенсивного фотосинтеза первый этап окисления глюкозы (гликолиз) ингибирован, а второй этап (цикл Кребса) может работать на свету со скоростью, равной темновой.

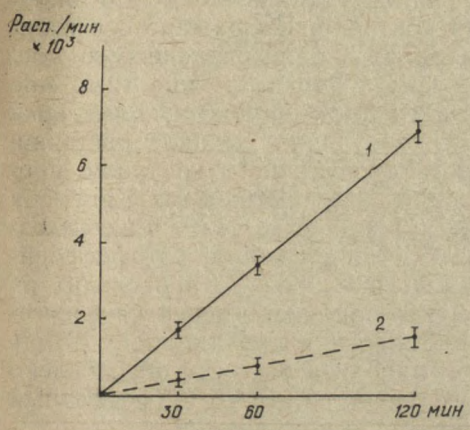


Рис. 1. Выделение $^{14}CO_2$ при окислении глюкозы-^{14}C клетками хлореллы на свету и в темноте: *1* — темнота; *2* — свет

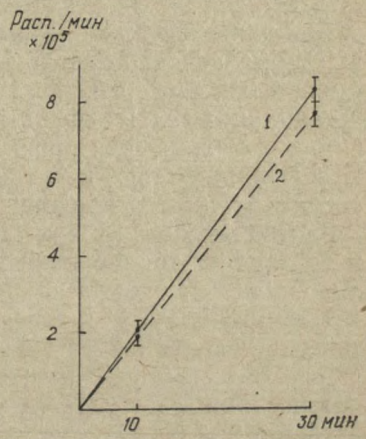


Рис. 2. Выделение $^{14}CO_2$ при окислении малата-^{14}C клетками хлореллы на свету и в темноте: *1* — темнота; *2* — свет

ОПФЦ в клетках хлореллы в условиях интенсивной культуры на свету не функционирует, так как подавлен синтез ключевых ферментов этого цикла [32].

Исследование метаболизма глюкозы-^{14}C показало, что меченый углерод при окислении на свету накапливается в монофосфатах сахаров [25, 26, 28, 33]. Это свидетельствует о существовании блока на уровне фосфофруктокиназы — ключевого фермента гликолиза. Последний достаточно хорошо изучен, и известно, что АТФ является его аллостерическим ингибитором. В связи с этим относительное повышение концентрации АТФ в цитоплазме вследствие работы «челнока», выносящего энергетические эквиваленты из хлоропласта, может ограничивать работу фосфофруктокиназы. Кроме того, снижение на свету в цитоплазме уровня $P_н$, интенсивно транспортируемого в хлоропласт, тоже может ограничивать активность этого фермента, поскольку известно, что она быстро снижается при уменьшении концентрации $P_н$ [5].

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют об

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ингибировании гликолиза в цитоплазме ассимилирующей зрелой клетки на свету в условиях фотосинтеза, блоки в этом пути окисления глюкозы находятся на уровне энергодающих реакций ФГА→ФГК, ФЕП→пируват и реакций, где участвует фосфофруктокиназа, а основным механизмом их ингибирования является аденилатный контроль. Положение о регуляции дыхания с помощью аденилатов и неорганического фосфора было детально разработано в биохимии животных еще в конце 50-х гг. Позднее эти идеи были широко использованы и при изучении факторов, регулирующих дыхание растений. Чтобы разобраться в сущности аденилатного контроля, проследим эволюцию представлений о нем. В работах Кандлера и Хебера высказывалась идея о том, что на свету в цитоплазме возникает конкуренция за АДФ и $P_н$ между фотофосфорилированием и теми реакциями гликолиза, где происходит их потребление [23, 24]. Открытие челночного переноса энергетических эквивалентов привело к возникновению идеи, что ограничение работы ферментов гликолиза на свету обусловлено повышением в цитоплазме отношения АТФ/АДФ (фосфатный потенциал) [34].

В 1982 г. в лабораториях Хелдта на современном методическом уровне было проведено определение содержания адениннуклеотидов в различных компартментах зеленой клетки листа пшеницы. Оказалось, что отношение АТФ/АДФ в цитоплазме на свету не только не увеличивается, а напротив, снижается по сравнению с темнотой [35]. Подобное изменение фосфатного потенциала, по-видимому, не может вызвать подавления гликолиза на свету в цитоплазме. Поэтому аденилатный контроль можно рассматривать как конкуренцию за АДФ и $P_н$ между фотофосфорилированием и реакциями гликолиза, связанными с их потреблением, т. е. мы возвращаемся к идеям Хебера и Кандлера 60-х гг. [23, 24].

Следующий вопрос состоит в том, всегда ли в ассимилирующей клетке на свету имеет место ингибирование гликолиза. Если предметом конкуренции между фотосинтетическим фосфорилированием и энергогенерирующими этапами дыхания является АДФ и $P_н$, то в условиях быстрой утилизации энергии АТФ, когда скорость образования АДФ и $P_н$ велика, ингибирования гликолиза может и не быть, т. е. степень его угнетения зависит от интенсивности процессов в клетке, связанных с потреблением АТФ.

В наших опытах мы изучали функционирование гликолиза и ОПФЦ при разных метаболитических нагрузках листа, т. е.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

в условиях различной скорости утилизации АТФ. В случае активной работы и высокой скорости оборота АТФ — АДФ и $P_н$ будут быстро освобождаться, можно ожидать отсутствия конкуренции за эти метаболиты между фотосинтезом и дыханием [36]. Для таких экспериментов был выбран первичный лист ячменя, где можно выделить зону роста клеток, растяжения и зону зрелых клеток. В каждую из изолированных зон листа вводили равномерно меченую глюкозу и наблюдали выделение $^{14}CO_2$ в темноте и на свету при высокой концентрации CO_2, т. е. практически исключали реассимиляцию. Кроме

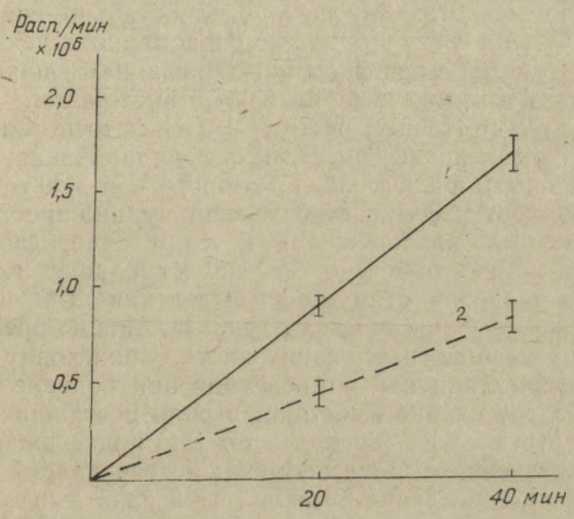


Рис. 3. Выделение $^{14}CO_2$ при окислении глюкозы-^{14}C в зоне растяжения листа ячменя на свету и в темноте: *1* — темнота; *2* — свет

Таблица 1

Выделение $^{14}CO_2$ при окислении глюкозы в зоне зрелых клеток листа ячменя на свету и в темноте, расп/мин 10^6 · г сухой массы

Условия опыта	^{14}C-1-глюкоза	^{14}C-1,6-глюкоза
На свету	0,23±0,04	1,81±0,04
В темноте	0,55±0,01	3,51±0,03

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

того, чтобы ориентировочно оценить участие гликолиза и ОПФЦ в окислении глюкозы, сравнивали выделение $^{14}CO_2$ из глюкозы, равномерно меченной и меченной в первом положении. Оказалось, что в зоне зрелых клеток выделение $^{14}CO_2$ подавлено на свету в обоих вариантах, а доля $^{14}CO_2$, выделяющегося при работе ОПФЦ (окисление глюкозы-1-^{14}C), сравнительно мала. Это подтверждается и данными об уменьшении в этой зоне активности ключевого фермента ОПФЦ — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Аналогичные данные получены и для зоны растяжения листа ячменя. Эти данные можно трактовать так, что ОПФЦ может играть малую роль в общем дыхании этих зон листа, следовательно, снижение выделения CO_2 на свету в опытах с равномерно меченной глюкозой определяется в основном ингибированием гликолиза [36].

Мысль о том, что ингибирование вызывается не светом, а фотосинтезом (точнее, работой I и II фотосистем) и сопряженным с ними процессом фотофосфорилирования, доказывают наши опыты на ячмене, у которого в результате предпосевной обработки семян стрептомицином нижние 2/3 первичного листа были альбиносными. В этих бесхлорофильных тканях листа ячменя отмечено не ингибирование гликолиза и ОПФЦ, а напротив, стимуляция выделения $^{14}CO_2$ на свету из равномерно меченной глюкозы (рис. 4). Можно предполагать, что в этих альбиносных тканях листа происходит усиление темнового дыхания как компенсация при подавленном фотосинтезе, т. е. дыхание выступает в роли поставщика субстратов и энергетических эквивалентов. Это подтверждается опытами по изучению CO_2-газообмена; интенсивность дыхания в альбиносной зоне листа была в 1,5—2 раза выше, чем в тех же участках зеленого листа, где гликолиз и ОПФЦ на свету были подавлены. Таким образом, решающая роль в ингибировании этих этапов дыхания принадлежит именно фотосинтезу, а не свету как таковому.

В вышеупомянутых исследованиях речь шла о работе гликолиза и ОПФЦ в зрелых клетках хлореллы или в зонах листа ячменя с дифференцированными клетками. Обратимся теперь к результатам наших опытов, полученных на модельных объектах, которые находятся в стадии активного роста. В качестве таких объектов были выбраны растущие листья тополя, площадь которых составляет 15—20% от максимальной (рис. 5), и клетки меристематической зоны листа ячменя, когда метаболитическая нагрузка на них велика. В этих случаях ингибирования гликолиза и ОПФЦ на свету не происходит.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

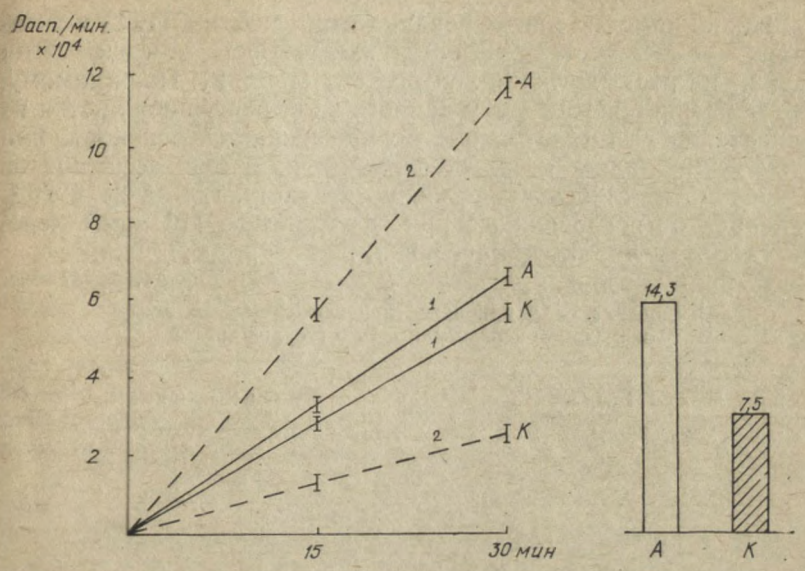


Рис. 4. Выделение $^{14}CO_2$ при окислении глюкозы-^{14}C на свету и в темноте (в расп/мин·10^4) и дыхание альбиносных и зеленых зон листа ячменя (в мг CO_2/г сырой массы/ч): *А* — альбиносная зона; *К* — контрольная зона (зеленая); *1* — темнота; *2* — свет

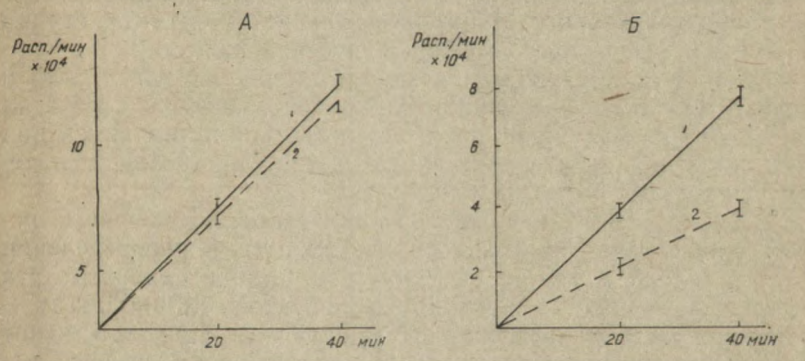


Рис. 5. Выделение $^{14}CO_2$ при окислении глюкозы-^{14}C листьями тополя канадского на свету и в темноте: *А* — растущие листья; *Б* — зрелые листья; *1* — темнота; *2* — свет

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Не обнаружено ингибирования гликолиза и ОПФЦ и у листьев ранневесеннего эфемероида-чистяка (Ficaria verna Huds.) на разных стадиях онтогенеза (табл. 2). По-видимому, это объясняется тем, что у данного вида растущие листья из акцепторов ассимилятов быстро превращается в донора, при этом осуществляется большая работа по оттоку ассимилятов в подземные клубеньки, особенно на свету, где за 24 ч 75% углерода от поглощенного при фотосинтезе (10 мин.) передвигается из листьев в клубеньки.

Таблица 2

Выделение $^{14}CO_2$ при окислении глюкозы-^{14}C на свету и в темноте, расп/мин · 10^6 · г сухой массы

Условия опыта	Меристематическая зона листа ячменя	Фикария		
		«молодая»	«зрелая»	«старая»
На свету (30—40 мин)	2,3	0,6	0,4	0,4
В темноте (30—40 мин)	2,7	0,6	0,4	0,4

Таким образом, приведенные данные подтверждают идею О. В. Заленского о том, что регуляция парциального участия фотосинтеза и дыхания в общеклеточной работе осуществляется изменением уровня энергетических и субстратных затрат в клетке [37]. На вопрос о том, ингибированы ли на свету в ассимилирующей клетке окислительные этапы дыхания, нельзя дать однозначного ответа, все зависит от объекта, стадии онтогенеза листа и его метаболитической нагрузки.

Наряду с аденилатным контролем дыхания могут быть и другие механизмы регуляции гликолиза в зеленой клетке на свету. Эта регуляция может осуществляться путем изменения в распределении потока углерода между гликолизом и синтезом сахарозы в цитоплазме.

В последнее время появился цикл работ, посвященных регуляторной роли фруктозы-2,6-бисфосфата в распределении потока углерода между синтезом крахмала и сахарозы. Эта «фальшивая монета» ингибирует фруктозо-1,6-бисфатазу — ключевой фермент на пути синтеза сахарозы. При этом может усиливаться синтез крахмала в хлоропласте или углерод поступает в цитоплазму и участвует в реакциях окисления. На ферментах, выделенных из листьев шпината и гороха, показано, что этот метаболит может стимулировать работу пиро-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

фосфатзависимой фосфофруктокиназы — ключевого фермента гликолиза — и ингибировать ключевой фермент синтеза сахарозы [38]. Известно, что образование фруктозо-2,6-бисфосфата происходит с участием фермента фруктозо-6-фосфат-2-киназы, активность которого стимулируется $P_н$ и ингибируется 3-ФГК и диоксиацетонфосфатом. Однако в каких условиях происходит инициация этого фермента в растительной клетке, пока не ясно.

Согласно современным представлениям в автотрофной клетке на свету обычно возникает ситуация, когда происходит переключение потока углерода из русла окислительных реакций гликолиза и ОПФЦ на восстановительные реакции, ведущие к синтезу сахарозы в цитоплазме. Механизмы регуляции ОПФЦ на свету идентичны в обоих компартментах клетки (ингибирование ключевого фермента увеличением уровня восстановленности клетки).

Что касается регуляции гликолиза на свету, то эти механизмы различны. В хлоропластах ингибирование ключевого фермента гликолиза обусловлено увеличением pH стромы и появлением продуктов цикла Кальвина, а также увеличением уровня АТФ и $НАДФН_2$. В цитоплазме регуляция гликолиза со стороны фотосинтеза опосредована работой переносчиков через мембраны хлоропласта, которые могут выносить в цитоплазму энергетические эквиваленты.

В зрелой автотрофной клетке, где совершается работа лишь по поддержанию структур, в цитоплазме может возникать конкуренция за АДФ и $P_н$ между энергодающими этапами гликолиза и скоростью разгрузки челноков хлоропласта, что приводит к ингибированию гликолиза. В клетках с большой метаболической нагрузкой (рост, активный транспорт ассимилятов) происходит быстрая утилизация энергии АТФ, и ситуации, приводящей к конкуренции за АДФ и $P_н$, не возникает. Поэтому ингибирования гликолиза на свету в этом случае не наблюдается.

Остается нерешенным вопрос о количественном соотношении окислительных путей дыхания, локализованных в хлоропластах и в цитоплазме, а также о количественном вкладе в общее русло окисления глюкозы в ассимилирующей клетке в темноте и об их изменении на свету.

Возможны и другие механизмы регуляции гликолиза и синтеза сахарозы в цитоплазме на свету и в темноте с помощью «фальшивой монеты» (фруктозо-2-6-бисфосфата), но многие детали этой метаболитной регуляции еще не ясны.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ЛИТЕРАТУРА

1. Heber U., Hallier U. W., Hudson M. A. Untersuchungen zur intrazellularen Verteilung von Enzymen und Substraten in der Blattzelle II. Lokalization von Enzymen des reductiven und dem oxydativen Pentosephosphat-Zyklus in den Chloroplasten und Permiabilität der Chloroplasten-Membran gegenüber Metaboliten. — Z. Naturf., 1967, B. 22b, N 11, S. 1200—1215.

2. Lendzian K., Ziegler H. Über die Regulation der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in Spinatchloroplasten durch Licht. — Planta, 1970, B. 94, S. 27—36.

3. Lendzian K., Bassham J. A. Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in spinach chloroplasts by ribuloso-1,5-diphosphate and NADPH/NADP+ ratios. — Biochim. Biophys. Acta, 1975, v. 396, p. 260.

4. Kelly G. J., Latzko E. Evidence for phosphofructokinase in chloroplasts. — Nature, 1975, v. 256, p. 429.

5. Kelly G. J., Latzko E. Chloroplast phosphofructokinase. 1. Proof of phosphofructokinase activity in chloroplasts. — Plant Phys., 1977, v. 60, N 6, p. 290—294.

6. Levi C., Gibbs M. Starch degradation in isilated spinach chloroplasts. — Plant Physiol., 1976, v. 57, N 6, p. 933—935.

7. Peavey D. G., Steup M., Gibbs M. Characterisation of starch breakdown in the intact spinach chloroplast. — Plant Physiol., 1977, v. 60, N 2, p. 305—308.

8. Scheibe R., Beck E. Formation of C_4-dicarboxylic acids by spinach chloroplasts. — Planta, 1975, v. 143, N 1, p. 63—67.

9. Williams M., Randall D. D. Pyruvate dehydrogenase complex from chloplasts of Pisum sativum L. — Plant Physiol., 1979, v. 64, N 6, p. 1099—1103.

10. Stitt M., ap Rees T. Capacites of pea chloroplasts to catalyse the oxidative pentose phosphate pathway and glycolysis. — Phytochemistry, 1979, v. 18, N 12, p. 1905—1911.

11. Ellias B. A., Givan C. V. Localization of pyruvate dehydrogenase complex in Pisum sativum chloroplasts. — Plant Sci. Lett., 1979, v. 17, p. 115—122.

12. Schulze-Siebert D., Heincke D., Scharf H., Schultz G. Pyruvate-derived amino acids in spinach chloroplasts. — Plant Physiol., 1984, v. 76, N 2, p. 465—471.

13. Buchanan B. B. Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. — Ann. Rev. Plant Physiol., 1980, v. 31, p. 341—374.

14. Anderson L. E., Lim Ng T. C., Park R. E. Y. Inactivation of pea leaf chloroplastic and cytoplasmic glucose 6-phosphate derydrogenases by light and dithiothreitol. — Plant Physiol., 1974, v. 53, N 6, p. 835—839.

15. Krause G. H., Bassham J. A. Induction of respiratory metabolism in illuminated Chlorella pyrenoidosa and isolated spinach chloroplasts by the addition of vitamin K_5. — Biochim. Biophys. Acta, 1969, v. 172, N 3, p. 553—558.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

16. Lendzian K. J. Metabolism of specifically labeled glucose, glucose 1-phosphate and glucose-6-phosphate cycle in a reconstitued spinach chloroplast system in darkness and in the light. — Plant Physiol., 1980, v. 66, N 1, p. 8—12.

17. Kelly G. J., Latzko E. Regulation aspects of photosynthetic carbon metabolism. — Ann. Rev. Plant Physiol., 1976, v. 27, p. 184—205.

18. Kaiser W. M., Bassham J. A. Light-dark regulation of starch metabolism in chloroplasts. 1. Levels of metabolites in chloroplasts and medium during light-dark. — Plant Physiol., 1979, v. 63, N 1, p. 105—109.

19. Buchanan B. B., Wolosiuk R. A., Schürmann P. Thioredoxin and enzyme regulation. — Trends Biochem. Sci., 1979, v. 4, p. 93—96.

20. Akamba L. M., Anderson L. E. Light modulation of glyceraldehyde-3-phosphate derydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase by photosynthetic electron flow in pea chloroplasts. — Plant Physiol., 1981, v. 67, N 2, p. 197—200.

21. Stitt M., Heldt H. W. Simultaneous synthesis and degradation of starch in spinach chloroplasts in the light. — Biochim. Biophys. Acta, 1981, v. 638, N 1, p. 1—11.

22. Lendzian K., Ziegler H. Über die Regulation der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in Spinatchloroplasten durch Licht. — Planta, 1970, v. 94, N 1, p. 27—36.

23. Kandler O., Haberer-Liesenkötter J. Über die Zusammenhang zwischen Phosphathaushalt. — Z. Naturf., 1963, B. 18b, S. 718.

24. Heber U., Santarius K., Urbach W., Ullrich W. Intracellular Transport von ^{14}C und ^{32}P-markierten Intermediärprodukten zwischen der Chloroplasten und dem Cytoplasma und seine Folgen für die Regulation des Stoffwechsels. — Z. Naturforsch., 1964, B. 19b, S. 576—583.

25. Hirt G., Tanner W., Kandler O. Effect of light on the rate of glycolysis in Scenedesmus oblignus. — Plant Physiol., 1971, v. 47, N 4, p. 841—843.

26. Hirt G., Tanner W. Regulation of glycolysis by light in Scenedesmus. — In: Proc.. II Intern. Congress on Photosynthesis Res. Stresa, Italy. Hague, 1971, p. 1989—1992.

27. Карпилов Ю. С., Новицкая И. Л., Белобродская Л. К. и др. Реакции гликолиза в автотрофной клетке, роль в фотосинтетическом метаболизме и световом дыхании. — В кн.: Механизм фотодыхания и его особенности у растений различных типов. Пущино, 1978, с. 90—187.

28. Карпилов Ю. С., Новицкая И. Л., Белобродская Л. К. Влияние фотофосфорилирования на реакции гликолиза в клетках ассимилирующих тканей листьев проса. — Биохимия, 1977, т. 42, № 12, с. 2131—2139.

29. Степанова А. М., Шумилова А. А. Исследование функционирования гликолитического пути окисления глюкозы в зеленых листьях на свету. — Биохимия, 1974, т. 39, № 5, с. 929—935.

30. Верхотурова Г. С., Астафурова Т. П. Изучение функционирования гликолитического пути дыхания на свету в листьях фасоли. — В кн.: Вопросы биологии. Томск: Изд-во ТГУ, 1978, с. 77—82.

31. Заленский О. В., Зубкова Е. К., Мамушина Н. С., Филиппова Л. А. К вопросу о взаимоотношениях фотосинтеза и дыхания в ассимилирующей клетке. Исследование гликолиза и цикла Кребса на свету и в темноте в клетках хлореллы. — Бот. журн., 1980, т. 65, № 9, с. 1141—1149.

Научная библиотека для книг

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

32. Devlin R. M., Galloway R. A. Oxidative enzymes and pathways of hexose and triose metabolism in chlorella. — Physiol. Plantarum, 1868, v. 21, N 1, p. 11—25.

33. Заленский О. В., Зубкова Е. К., Мамушина Н. С., Филиппова Л. А. Взаимоотношения фотосинтеза и дыхания в ассимилирующей клетке. Метаболизм экзогенных субстратов дыхания в клетках хлореллы на свету и в темноте. — Физиол. раст., 1981, т. 28, № 5, с. 940—947.

34. Heber U. Metabolite exchange between chloroplasts and cytoplasm. — Ann. Rev. Plant Physiol., 1974, v. 25, p. 393—421.

35. Stitt M., Lilli R., Heldt H. M. Adenine nucleotide levels in the cytosol, chloroplasts and mitochondria of wheat leaf protoplasts. — Plant Physiol., 1982, v. 70, N 4, p. 971—977.

36. Филиппова Л. А., Мамушина Н. С., Зубкова Е. К. и др. Взаимоотношения фотосинтеза и дыхания у ассимилирующих клеток в разных зонах растущего листа ячменя. — Физиол. раст., 1986, т. 33, № 1, с. 66—73.

37. Семихатова О. А., Заленский О. В. Сопряженность процессов фотосинтеза и дыхания. — В кн.: Физиология фотосинтеза. М.: Наука, 1982, с. 130—145.

38. Cseke C., Weeden N. F., Buchanan B. B., Uyeda K. A special fructose bisphosphate functions as a cytoplasmic regulatory metabolite in green leaves. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, p. 4322—4326.

39. Stitt M., Cseke C., Buchanan B. B. Occurence of a metabolite-regulated enzyme synthesizing fructose-2-6-bisphosphate in plant sink tissues. — Physiol. Vegetale, 1985, v. 83, N 5, p. 819—827.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

РАБОТА ЦИКЛА КРЕБСА НА СВЕТУ И НЕКОТОРЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЕГО РЕГУЛЯЦИИ

Г. С. Верхотурова, Т. П. Астафурова, Л. И. Кудинова

Научно-исследовательский институт биологии и биофизики
при Томском университете

Изучение обмена органических кислот в зеленых листьях растений показало связь их метаболизма как с процессом дыхания, так и с процессом фотосинтеза [1—2]. Важная роль интермедиатов цикла ди- и трикарбоновых кислот как углеродных субстратов для многих биосинтезов выдвигала вопрос о его функционировании в ассимилирующей клетке на свету.

Еще в 1956 г. в экспериментах с экзогенной пировиноградной кислотой, которая поступала в клетки фотосинтезирующей водоросли Scenedesmus, было показано, что свет не может воздействовать на окисление пирувата в местах, пространственно удаленных от хлоропласта [3]. Дальнейшие опыты с хлореллой показали, что значительная радиоактивность из $C^{14}O_2$ на свету попадает в кислоты цикла Кребса, что также не поддерживало имевшиеся представления о световом ингибировании пируватного окисления [4]. Позднее работы по включению C^{14} в органические кислоты после ассимиляции $C^{14}O_2$ [5—7], а также многочисленные исследования с использованием меченых C^{14} экзогенных органических кислот [7—17] привели исследователей к выводу о функционировании на свету реакций цикла Кребса.

В опытах с $C^{14}O_2$ находили, что образование глутамата, цитрата и сукцината соответствует ходу цикла Кребса, а щавелево-уксусная кислота, необходимая для регенерации цикла, пополняется за счет реакций β-карбоксилирования [18]. Метка из радиоактивной глюкозы и органических кислот также активно включается в липиды и продукты цикла Кребса на свету и в темноте, в водоросли и зеленые листья растений [19]. Степень и пути использования экзогенной глюкозы в освещенных зеленых клетках еще достаточно не ясны. Вопрос состоит в том, преобразуется ли глюкоза до пирувата на свету или же используется после превращения до CO_2. Подобие

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

схем распределения радиоактивного углерода, полученных с использованием ацетата и пирувата, предполагает, что пируват преобразуется в ацетат, а затем поступает в интермедиаты цикла Кребса. На основании проведенных исследований сформировалось мнение о некоторой независимости метаболизма CO_2 от метаболизма экзогенных органических соединений.

Доказательства работы цикла Кребса на свету в зеленых листьях растений были получены также с применением ингибиторов фотосинтеза и дыхания при введении экзогенных органических кислот [7, 8, 20].

Известно, что цитрат, пируват, сукцинат, глутамат и аспартат, введенные экзогенно, легко проникают в митохондрии и используются так же быстро, как и их эндогенные формы [21]. В наших опытах для доказательства функционирования цикла Кребса на свету был использован цитрат-C^{14}, который вводили в листья вместе с ингибиторами дыхания. При введении радиоактивного цитрата не обнаруживается существенной разницы в количестве $C^{14}O_2$, выделенной на свету и в темноте, что согласуется с данными по использованию других органических кислот и указывающих на незначительную реассимиляцию углекислоты на свету [16].

Радиоактивный углерод активно поступал как в темноте, так и на свету, во все определяемые в листьях фасоли ди- и трикарбоновые кислоты: лимонную, яблочную, малоновую, янтарную. Снижение в опыте температуры до +1 —1 °С уменьшало количество меченого углерода в органических кислотах на свету и в темноте по сравнению с данными предыдущих опытов (табл. 1). Использование на свету ингибиторов дыхания фторида натрия и малоната показало, что окисление экзогенного цитрата происходит в цикле Кребса.

Под действием фторида натрия увеличивалось содержание эндогенной лимонной кислоты и не изменялась ее радиоактивность (рис. 1). Уменьшались как радиоактивность, так и содержание малата и сукцината, а также количество C^{14} в малоновой кислоте без существенных изменений ее содержания. Интерпретируя эти данные, следует учесть, что фторид натрия легко поступает в листья [22], преобразовываясь в клетках во фторцитрат, угнетающий активность аконитазы. Подобное превращение фторида натрия известно для листьев сои и показано с помощью инфракрасной спектрометрии [23].

При использовании малоновой кислоты в качестве ингибитора на фоне экзогенно введенного цитрата на свету не меня-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Таблица 1

Влияние света на содержание и радиоактивность ди- и трикарбоновых кислот в 12-дневных листьях фасоли, плавающих на 0,1 М растворе лимонной-3-C^{14} кислоты (pH 5,6). Экспозиция 2 ч, интенсивность света 35 тыс. эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$, активность 1 мл раствора 2 мкК

Варианты опыта	Содержание ди- и трикарбоновых числот, мг/г сухой массы				Радиоактивность кислот, имп/мин/г сухой массы			
	лимонной	яблочной	малоновой	янтарной	лимонной	яблочной	малоновой	янтарной
Температура 22—24 °С								
В темноте	7,26	1,73	8,52	1,99	6900	950	170	320
На свету	28,51	12,93	5,94	6,15	60300	3170	3010	1040
В темноте	4,45	1,86	7,91	1,67	5300	940	180	170
На свету	27,54	10,69	6,36	5,97	49500	4550	1300	2010
Температура —1+1 °С								
В темноте	5,66	7,29	12,38	—	4300	42	42	—
На свету	4,32	7,83	15,21	—	4100	27	39	—
В темноте	4,90	6,26	15,45	—	2900	35	74	—
На свету	4,22	7,96	15,44	—	3040	32	38	—

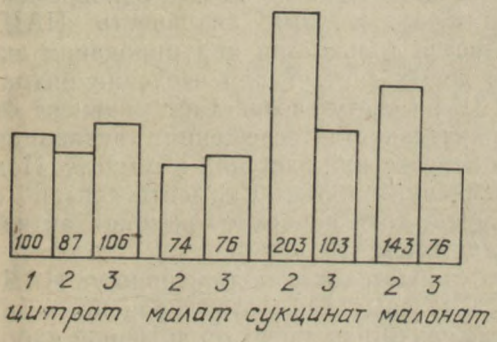


Рис. 1. Содержание и радиоактивность органических кислот в листьях фасоли на свету при введении с экзогенным раствором цитрата 3-C^{14} 0,05 м молоната (в%): *1* — содержание и радиоактивность в контроле на свету; *2* — содержание кислот в опыте на свету, *3* — радиоактивность кислот в опыте на свету

ются радиоактивность и содержание эндогенной лимонной кислоты и уменьшается радиоактивность яблочной и малоновой кислот, зависимых от малонатного блока сукцинатдегидрогеназы (рис. 2). Резко (в 2 раза) возрастает количество янтарной кислоты, то есть накапливается предшественник блокируемой реакции.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Рис. 2. Содержание и радиоактивность органических кислот в листьях фасоли на свету при введении с экзогенным раствором цитрата — 3-C^{14} 0,05 М фторида натрия (в %): *1* — содержание и радиоактивность в контроле на свету; *2* — содержание кислот в опыте на свету; *3* — радиоактивность кислот в опыте на свету

Таким образом, угнетение на свету аконитазы или сукцинатдегидрогеназы приводит к закономерным изменениям содержания и радиоактивности ди- и трикарбоновых кислот, связанных с более ранними или поздними ступенями цикла, чем катализируемые реакции.

С помощью перекрестной теоремы Чанса были исследованы кинетические данные по содержанию C^{14} в интермедиатах цикла Кребса и показана ключевая роль малат- и изоцитратдегидрогеназ, цитратсинтазы и фумаразы [8].

В наших опытах с листьями гороха была определена активность НАД- и НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ (ИДГ) (табл. 2) [24]. В этиолированных листьях одновременно работают оба фермента, а в зеленых активность НАД-зависимой ИДГ определяется только при индуцировании экзогенным цитратом. В зеленых листьях при введении цитрата активность НАДФ-ИДГ на свету возрастает, зависит от интенсивности и продолжительности освещения; активация фермента снимается при перенесении растений в темноту. Под влиянием света такое усиление работы фермента связано с митохондриальной фракцией, хотя наиболее высокая активность его определяется в цитоплазме.

Под влиянием света сохраняется высокая активность НАД-малатдегидрогеназы как в зеленых, так и этиолированных листьях. Полученные данные свидетельствуют об активной работе ферментов цикла на его начальном и заключительном этапах.

Вводя экзогенные интермедиаты цикла Кребса в ассимилирующие ткани исследуют потенциальные возможности его работы на свету. Оценка скорости цикла на свету и в темноте без функциональной нагрузки приводится в работе Raven [25], где сопоставлено количество углерода, прошедшего через цикл

Таблица 2

Активность НАДФ- и НАД-зависимых изоцитратдегидрогеназ в 8-дневных зеленых и этиолированных листьях гороха. Интенсивность света 40 тыс. эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$, экспозиция 2 ч

Фермент	Условия опыта	Зеленые листья		Этиолированные листья	
		На воде	На цитрате	На воде	На цитрате
НАДФ—ИДГ, мЕ/мг белка	В темноте	8,8±0,3	58,8±2,4	84,5±6,5	110,5±1,5
	На свету	7,9±1,0	73,9±3,6	76,5±7,8	109,3±1,0
НАД—ИДГ, мЕ/мг белка	В темноте	—	10,4±1,1	7,8±0,6	28,6±3,1
	На свету	—	13,1±1,0	3,3±1,1	20,3±3,6

Таблица 3

Активность НАД-, НАДН- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в зонах роста 7-дневных листьев ячменя

Зона роста	Активность ферментов, мЕ·мг белка				
	НАД-	НАДФ-	НАД-	НАДН-	НАДФ-
	изоцитратдегидрогеназы		малатдегидрогеназы		малик-энзи
Деление	2,66±0,33	23,64±2,94	293,8±17,6	311,5±17,6	2,99±0,27
Растяжение	3,54±0,21	17,98±3,16	217,4±9,6	375,3±26,1	2,70±0,14
Дифференцированные клетки	1,50±0,22	2,11±0,28	162,7±11,2	321,7±17,6	2,09±0,13

Digital Library (repository) of Tomsk State University http://vital.lib.tsu.ru

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Кребса в темноте (по выделению CO_2), и количество углерода в его продуктах (производных ацетил- и сукцинил-КоА, α-кетоглутарата) на свету. Высокий процент прироста углерода таких соединений свидетельствует о том, что скорость цикла в фотосинтезирующих тканях одинакова на свету и в темноте.

Подобные заключения о работе цикла на свету в условиях, не стимулируемых дыхательными субстратами, констатируются в модельных опытах с первичным листом злаковых. На листе при переходе от зоны деления к дифференцированным автотрофным клеткам можно проследить за развитием фотосинтетической функции и метаболических систем. В дифференцированных клетках митохондрии занимают площадь примерно в полтора раза меньше, чем в клетках зоны деления, резко уменьшается активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [26]; активность ферментов, связанных с циклом Кребса, хотя и уменьшается, но находится на довольно высоком уровне (табл. 3).

Если на свету могут быть ингибированы окислительный пентозофосфатный путь, гликолиз и электрон-транспортные митохондриальные реакции, физиологический смысл работы цикла Кребса очевиден. Он заключается в использовании пиридиннуклеотидов на синтез липидов, восстановительное аминирование, восстановление нитратов и потребности в метаболитах для биосинтезов [17, 25]. А преимущественная работа НАДФ-изоцитратдегидрогеназы по сравнению с НАД-зависимой, накопление глутамата и пролина указывают на его биосинтетическую роль на свету [24].

В ходе реакций цикла Кребса не может иметь места прирост углерода, так как каждый моль ацетил-КоА окисляется до 2 молей углекислого газа. Следовательно, если цикл поставляет промежуточные продукты для биосинтезов, должны существовать механизмы его регенерации. Это вопрос об источнике пирувата и оксалоацетата или других метаболитов для возобновления цикла Кребса на свету.

В настоящее время появляются данные о том, что гликолиз не подавляется светом [27, 28] и что образование пировиноградной кислоты происходит при фотосинтезе [25, 29]. Но вероятным источником углерода для цикла Кребса может быть фосфоэнолпируват, образованный из триозофосфата фотосинтетического происхождения [30]. Такая связь фотосинтеза и дыхания с помощью ФГК предполагается возможной в неблагоприятных для фотосинтеза условиях среды [31] и показана в опытах при стимулировании цикла Кребса ионами

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

аммония [17]. При неизменной интенсивности фотосинтеза на свету увеличивалась радиоактивность во фракции аминокислот, глутамате и белках, т. е. метаболитах, связанных своим образованием с циклом Кребса.

Однако экспорт триозофосфатов из хлоропласта не может быть существенным источником углерода для ЦТК во время фотосинтеза, поскольку в цитоплазме они должны использоваться, например, на синтез сахарозы. Другими источниками углеродных скелетов могут быть серин и другие метаболиты, являющиеся продуктами анаплеротических карбоксилирующих реакций. Образование пирувата происходит при дезаминировании серина [37]. Существует точка зрения, что для образования пировиноградной кислоты могут использоваться также метаболиты фотодыхания [30, 32].

Кроме того, цикл Кребса в ассимилирующих клетках может функционировать в модифицированном виде. Так, у синезеленых водорослей цикл трикарбоновых кислот разомкнут на уровне α-кетоглутаратдегидрогеназы [25, 33], поэтому меченый ацетат является источником глутамата на свету, и схема мечения находится в соответствии с его образованием путем прямого действия цикла. Однако ацетат не метит аспартат и сукцинат, и возникают они путем обращения ЦТК из оксалоацетата, образованного β-карбоксилированием. Возможность подобного пути образования сукцината показана в освещенных листьях Triticum [34] наряду с окислительным ходом цикла. Нужно сказать, что полный обращенный восстановительный цикл карбоновых кислот связан с синтезом молекулы ацетил-КоА и двух молекул CO_2 и обнаружен только у представителей фототрофных бактерий Clorobium limicola forma thiosulfatophilum [35]. Большие количества органических кислот, накапливающиеся в клетках [2], взаимопревращения яблочная $\rightleftarrows$ лимонная кислота [36], связь их метаболизма на свету одновременно с реакциями как фотосинтеза, так и дыхания [11, 14], предполагают их роль как источников углерода для работы цикла Кребса. В литературе в виде такого субстрата рассматривается малат вакуолярного и хлоропластного происхождения, который включается в цикл Кребса прямо или после декарбоксилирования до пирувата [37], и обсуждается вопрос об использовании для работы цикла любого из его интермедиатов [30].

В наших исследованиях, проведенных на различных клеточных структурах, показана одновременная работа малатдегидрогеназ с различной коферментной специфичностью

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

(рис. 3). В хлоропластах активно работающие НАДФН- и НАДН-малатдегидрогеназы образуют яблочную кислоту, которая в цитоплазме может декарбоксилироваться НАДФ-малик-энзимом до пирувата, который поступает в цикл. В цитоплазме и митохондриях малат превращается в щавелево-уксусную кислоту с помощью НАД-зависимого фермента, активность которого здесь высока. Так как скорости пируватного транспорта невелики и составляют 16—33% от скоростей малатного транспорта [38], то вероятнее всего цикл Кребса мо-

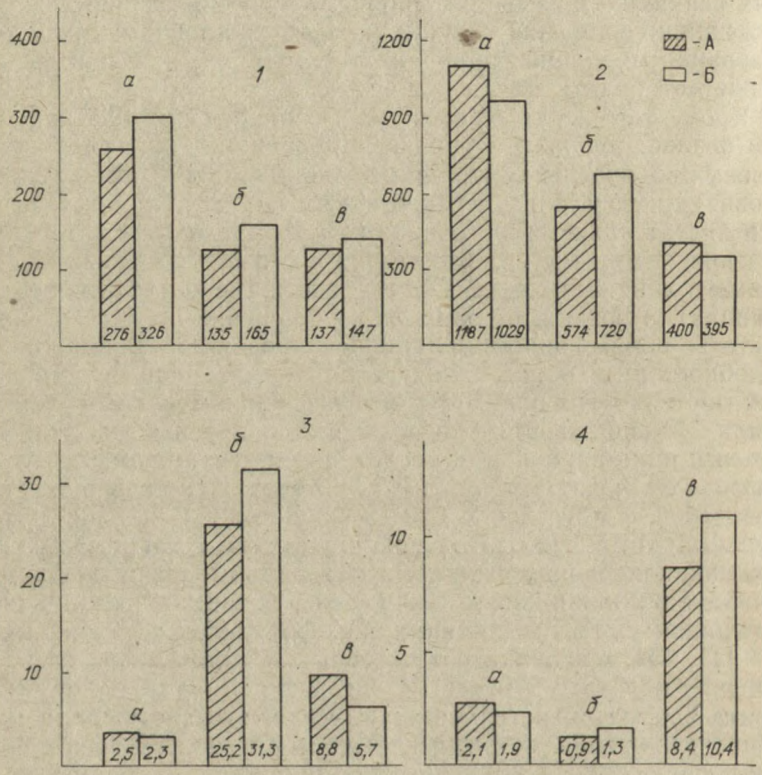


Рис. 3. Действие света на активность НАД- (*1*), НАДН- (*2*), НАДФН- (*3*) малатдегидрогеназ и НАДФ-малик-энзима (*4*) во фракциях, обогащенных митохондриями (*а*), хлоропластами (*б*) и в цитоплазме (*в*) зеленых листьев гороха, плавающих на 0,1 М растворе цитрата в темноте (*А*) и на свету (*Б*). Экспозиция — 5 ч, интенсивность света — 40000 эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

жет функционировать на свету, поддерживаемый яблочной кислотой, образованной в разных компартментах.

Относительно других интермедиатов цикла можно сказать, что источником углерода для его работы на свету могут быть цитрат или изоцитрат. Вероятно образование цитрата в хлоропластах из пирувата через пируватдегидрогеназный комплекс и конденсацию активного ацетила со щавелево-уксусной кислотой [39, 40]. Изоцитрат может возникать из фотодыхательного глиоксилата и сукцината в присутствии каталитических количеств ацетил-КоА [30].

Таким образом, функционирование цикла Кребса на свету очевидно, но необходимо дальнейшее исследование источников углерода для его работы, регуляторных механизмов, связи с процессом фотосинтеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Солдатенков С. В. Обмен органических кислот у растений. — М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1971. — 44 с.

2. Ренсон С. Кислоты растений. — В кн.: Биохимия растений. М.: Мир, 1968, с. 288.

3. Milhaud G., Benson A. A., Calvin M. Metabolism of pyruvic acid-2-C^{14} and hydroxypyruvic acid-2-C^{14} in algae. — J. Biol. Chem., 1956, v. 218, p. 599.

4. Bassham J. A., Kirk M. Dynamics of the photosynthesis of carbon compounds. I. Carboxylation reactions. — Biochem. Biophys. Acta, 1960, v. 43, N 3, p. 410

5. Stutz R. E., Burris R. H. Photosynthesis and metabolism of organic acids in higher plants. — Plant physiology, 1951, v. 26, N 2, p. 226.

6. Моиз А. Продукты фиксации CO_2 растениями. Соотношение между фотосинтезом и дыханием. — В кн.: Механизм фотосинтеза: Тр. V международного биохимического конгресса, симпозиум VI. М.: Изд-во АН СССР, 1962, с. 321.

7. Chapman E. A., Graham D. The effect of light on the tricarboxylic acid cycle in green leaves. I. Relative rates of the cycle in the dark and the light. — Plant Physiol., 1974, v. 53, p. 879.

8. Chapman E. A., Graham D. The effect of light on the tricarboxylic acid cycle in green leaves. II. Intermediary metabolism and the location of control points. — Plant physiol., 1974, v. 53, p. 886.

9. Graham D., Walker D. A. Some effects of light on the interconversion of metabolites in green leaves. — Biochem. J., 1962, v. 82, p. 554.

10. Marsh H. V., Galmishe J., Gibbs M. Effect of light on the tricarboxylic acid cycle in Scenedesmus. — Plant physiol., 1965, v. 40, N 6, p. 905.

11. Титлянов Э. А., Степанова А. М., Чесноков В. А. Обмен органических кислот в листьях ревеня на свету при ингибировании фотосинтеза и дыхания. — Сельскохозяйственная биология, 1968, т. 3. № 5, с. 688.

12. Окунцов М. М., Верхотурова Г. С. Влияние света на поступление радиоактивного углерода из экзогенных растворов глюкозы в

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ди- и трикарбоновые кислоты листьев фасоли. — Научные доклады высшей школы. Биологические науки, 1971, № 10, с. 76.

13. Степанова А. М., Баранова А. А. Влияние света на обмен органических кислот в листьях ревеня и табака. — Биохимия, 1972, т. 37, вып. 3, с. 520.

14. Шумилова А. А., Федосеенко А. А., Степанова А. М. Влияние света на функционирование цикла Кребса в листьях кукурузы. — Научные доклады высшей школы. Биологические науки, 1976, № 9, с. 87.

15. Заленский О. В., Зубкова Е. К., Мамушина Н. С., Филиппова Л. А. К вопросу о взаимоотношениях фотосинтеза и дыхания в ассимилирующей клетке. Исследование гликолиза и цикла Кребса на свету и в темноте в клетках хлореллы.— Ботанический журнал, 1980, т. 65, № 9, с. 1141.

16. Заленский О. В., Зубкова Е. К., Мамушина Н. С., Филиппова Л. А. Взаимоотношение фотосинтеза и дыхания в ассимилирующей клетке. Метаболизм экзогенных субстратов дыхания в клетках хлореллы на свету и в темноте. — Физиология растений, 1981, т. 28, вып. 5, с. 940.

17. Филиппова Л. А., Мамушина Н. С., Заленский О. В. О функционировании основных этапов темнового дыхания во время фотосинтеза. — Ботанический журнал, 1982, т. 67, № 9, с. 1169.

18. Kent S. S. Photosynthesis in the higher plant Vicia faba. II. Non Calvin cycle origin of acetate and its metabolic relationship to the photosynthetic origin of formate. — J. Biol. Chem., 1972, v. 247, p. 7293.

19. Racusen D., Forte M. Amino-acid turnover and protein synthesis in leaves. — Arch. Biochem. Biophys., 1960, v. 90, p. 90.

20. Верхотурова Г. С. Доказательство протекания в листьях фасоли на свету некоторых реакций цикла Кребса. — В кн.: Биология. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1977, т. 8, с. 134.

21. Steer B. T., Beevers H. Compartmentation of organic acids in corn roots. III. Utilization of exogenously supplied acids. — Plant physiol., 1967, v. 42, N 9, p. 1197.

22. Collet G. F. Biological effect of fluoride on plants. — Fluoride Quart. Repts., 1969, v. 2, N 4, p. 410.

23. Cheng J. Ye-O, Yu M.-H., Miller G. W., Welkie G. W. Fluoroorganic acids in soybean leaves exposed to fluoride. — Environ. Sci. and Technol., 1968, v. 2, N 5, p. 376.

24. Верхотурова Г. С., Астафурова Т. П. О направлении некоторых реакций цикла Кребса в зеленых листьях на свету. — Физиология растений, 1983. т. 30, вып. 3, с. 580.

25. Raven J. A. Endogenous inorganic carbon sources in plant photosynthesis. I. Occurrence of the dark respiratory patways in illuminated green cells. — New Phytol., 1972, v. 71, p. 227.

26. Филиппова Л. А., Мамушина Н. С., Зубкова Е. К., Мирославов Е. А., Кудинова Л. И. Взаимоотношения фотосинтеза и дыхания ассимилирующих клеток в разных зонах растущего листа ячменя. — Физиология растений, 1986, т. 33, вып. 1, с. 66.

27. Степанова А. М., Шумилова А. А. Исследование функционирования гликолитического пути окисления глюкозы в зеленых листьях на свету. — Биохимия, 1974, т. 39, вып. 5, с. 929.

28. Верхотурова Г. С., Астафурова Т. П. Изучение функционирования гликолитического пути дыхания на свету в листьях фасоли. — В кн.: Вопросы биологии. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1978, с. 77.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

29. Астафурова Т. П., Верхотурова Г. С., Волкова О. В., Боровая О. А. К вопросу о функционировании гликолиза в зеленых листьях гороха на свету. — См. настоящий сборник.

30. Singh P., Naik M. S. Effect of photosynthesis on dark mitochondrial respiration in green cells. — FEBS Letters, 1984, v. 165, N 2, p. 145.

31. Тарчевский И. А. Механизм влияния засухи на фотосинтетическое усвоение CO_2. — В кн.: Физиология фотосинтеза. М.: Наука, 1982. — с. 118.

32. Маслов А. И., Кузьмин А. Н. Возможные взаимодействия фотодыхания и темнового дыхания. — В кн.: Связь метаболизма углерода и азота при фотосинтезе: Тезисы докладов. Пущино, 1985, с. 17.

33. Терехова И. В., Чернядьев И. И., Доман Н. Г. Функционирование цикла трикарбоновых кислот на свету у цианобактерии Spirulina platensis. — Прикладная биохимия и микробиология, 1983, т. 19, № 4, с. 473.

34. Bidwell R. G. S. Phatways leading to the formation of amino-acids and amides in leaves. — Can. J. Bot., 1963, v. 41, p. 1623.

35. Evans M., Buchanan B., Arnon D. A new ferredoxin — dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, v. 55, N 4, p. 928.

36. Чесноков В. А., Жаботинский Г. Х. Влияние света на превращение органических кислот в листьях. — В кн.: Вопросы экспериментальной биологии: Тр. /Петергоф. биол. ин-т. Л.: Изд-во Лен. ун-та, 1960, № 18, с. 3.

37. Kent S. S. Photosynthesis in the higher plant Vicia faba. V. Role of malate as a precursor of the tricarboxylic acid cycle. — Plant physiol., 1979, v. 64, p. 159.

38. Day D. A., Hanson J. B. Pyruvate and malate transport and oxidation in corn mitochondria. — Plant physiol., 1977, v. 59, p. 630.

39. Williams M., Randall D. D. Pyruvate dehydrogenase complex from chloroplasts of Pisum sativum L. — Plant physiol., 1979, v. 64, N 6, p. 1099.

40. Givan C. V. The source of acetyl coenzyme A in chloroplasts of higher plants. — Physiol. plant., 1983, v. 57, N 2, p. 311.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

К ВОПРОСУ О ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ГЛИКОЛИЗА В ЗЕЛЕНЫХ ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ НА СВЕТУ

Т. П. Астафурова, Г. С. Верхотурова, О. В. Волкова, О. А. Боровая

Научно-исследовательский институт биологии и биофизики при Томском университете

Вопрос об ингибировании гликолиза в зеленых листьях растений на свету до недавнего времени большинством исследователей решался однозначно. Этот вывод основывался на классических представлениях о локализации, функционировании и регуляции гликолиза. Он подкреплялся экспериментальными данными по газообмену, динамике метаболитов, активности ферментов и логично объяснялся с точки зрения аденилатной теории регуляции дыхания. Однако в последнее время появились данные о том, что некоторые ключевые ферменты гликолиза (фосфофруктокиназа, пируваткиназа), а также конечный продукт гликолиза пируват и пируватдетдрогеназный комплекс обнаружены в хлоропластах [1—6]. Сравнительно недавно было показано, что не всегда и не во всех компартментах клетки наблюдается увеличение отношения АТФ/АДФ на свету [7] и, наконец, стали появляться работы о возможности функционирования гликолиза в зеленых растениях на свету [8—10]. Поэтому вопрос о функционировании гликолиза в ассимилирующих клетках в органах возник снова и продолжает оставаться дискуссионным.

Методика

Объектом исследования служили 12-дневные растения фасоли (Phaseolus multiflorus L.), 8-дневные проростки гороха (Pusum sativum L.) и ячменя (Hordeum vulgare L.), выращенные в лабораторных условиях под люминесцентными лампами интенсивностью 40000 эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$. Экзогенные субстраты: 1% глюкоза (в отдельных опытах использовали глюкозу — 1,6-С^{14} активностью 2 мкК в 1 мл), 0,1 М цитрат, 0,05 М малат и сукцинат (pH 5,6) поступали в растения либо путем транспирационного тока через проводящие пути, либо погло-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

щением растворов поверхностью плавающего листа. Фторид натрия (0,05 М), ФГК (10 мкМ, pH 5,6), АДФ (1 мМ) и АТФ (1 мМ) добавляли к экзогенным растворам глюкозы или цитрата. Опыты при температуре —1 °С проводили в рефрижераторной комнате. Гипоксию создавали в термобарокамере ТГ50,4 (ГДР) при давлении кислорода 8,56 мм рт. ст. Зоны роста развивающегося листа ячменя выделяли, как описано ранее [11]. Содержание органических кислот и пирувата определяли по общепринятым методикам [12, 13].

Результаты и обсуждение

В большинстве экспериментальных работ об ингибировании гликолиза в зеленых растениях на свету судили по уменьшению выделения $C^{14}O_2$ из меченой глюкозы. Однако при изучении метаболизма глюкозы-C^{14} было обнаружено, что ее превращение в листьях высших растений происходит с образованием меченых ди- и трикарбоновых кислот (ДТК) [8, 9]. На свету в зеленых листьях фасоли значительно возрастает как общая, так и удельная радиоактивность лимонной, яблочной и малоновой кислот при неизменном их содержании (табл. 1). Количественное уменьшение выделяющегося $C^{14}O_2$ при одновременном увеличении метки в ДТК можно объяснить реассимиляцией углекислоты в процессе фотосинтеза при ингибировании отдельных этапов окисления глюкозы. Однако эти же факты можно объяснить с иных позиций. Имеются данные о том, что часть радиоактивной глюкозы сразу же включается в прямые фотохимические преобразования, которые отличаются от темновых тем, что глюкоза может превращаться в другие соединения без предварительного разложения до $C^{14}O_2$ (изомерация радиоактивной глюкозы во фруктозу, а также светозависимый синтез сахарозы и крахмала [14]). Поэтому в дыхательный метаболизм на свету, вероятно, вовлекается только часть экзогенной глюкозы, что в конечном итоге приводит к несоответствию между поступлением глюкозы-C^{14} и выделением $C^{14}O_2$. Кроме того, имеется еще отвлечение меченого углерода глюкозы на свету — это биосинтетические реакции цикла Кребса, приводящие к синтезу аминокислот, радиоактивность которых при введении глюкозы-C^{14} возрастает на свету, что также может привести к уменьшению количества выделяемого $C^{14}O_2$ [5, 9]. Повышение радиоактивности органических кислот в зеленых листьях растений на свету ингибируется фторидом натрия, а также снимается отрицательной

Таблица 1

Содержание ди- и трикарбоновых кислот и их радиоактивность в 12-дневных листьях фасоли, погруженных черешками в 1% раствор глюкозы — 1,6-C^{14} на 6 ч. Интенсивность света 35 тыс. эрг/см^2. с. активность 1 мл глюкозы -1,6-C^{14} 2 мкК

№ опыта	Условия опыта	Содержание ди- и трикарбоновых кислот, мг/г сухой массы			Общая радиоактивность, имп/мин·г сухой массы			Удельная активность, имп/мин·мг/моль		
		Лимон.	Яблочн.	Малон.	Лимон.	Яблочн.	Малон.	Лимон.	Яблочн.	Малон.
				При положительной t°						
1.	В темноте	2,68	4,61	13,17	650	1910	680	46700	55700	5410
	На свету	1,59	3,11	16,09	1040	3220	1200	127900	139100	8270
2.	В темноте	2,99	4,93	15,22	870	2140	750	66400	58400	5130
	На свету	1,72	5,53	12,77	1320	7170	1020	148900	174200	8410
				При температуре —1 °С						
3.	В темноте	2,42	5,28	17,47	136	287	25	5610	5440	143
	На свету	1,74	3,82	14,35	90	230	14	5260	6010	97
4.	В темноте	2,16	4,87	15,75	1190	378	17	5500	7760	108
	На свету	1,67	4,40	13,85	65	160	16	3890	5640	93
				При ингибировании						
5.	На свету	3,41	4,47	11,00	4270	1003	182	241000	90000	2100
	На свету+NaF	4,11	4,60	9,48	2965	613	111	138500	17800	1200
6.	На свету	4,13	3,28	7,09	3209	1258	150	149000	51500	2200
	На свету+NaF	4,12	3,69	11,00	2688	649	126	125600	23700	1190

Digital Library (repository) of Tomsk State University http://vital.lib.tsu.ru

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

температурой (см. табл. 1). Дальнейшие исследования показали, что в освещенных листьях при введении экзогенной глюкозы сохраняется высокое содержание пировиноградной кислоты. Угнетение гликолиза фторидом натрия также приводит к уменьшению количества пирувата на свету и в темноте, что свидетельствует об ингибировании энолазы (табл. 2). Экзо-

Таблица 2

Содержание пирувата в зеленых листьях гороха, плавающих на 1% растворе глюкозы. Экспозиция 5 ч, интенсивность света 40000 эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$

№ опыта	Условия опыта	Содержание пирувата	
		мкМ/г сырой массы	%
1	В темноте	0,480±0,041	100
	На свету	0,475±0,050	98
2	В темноте	0,898±0,079	100
	В темноте+NaF	0,604±0,059	
	На свету	0,861±0,091	100
	На свету +NaF	0,442±0,033	51
3	На свету	0,854±0,070	100
	На свету+АДФ	1,092±0,102	128
4	На свету	0,475±0,041	100
	На свету+АТФ	0,499±0,050	105

генно введенный АДФ, наоборот, вызывает некоторое увеличение содержания ПВК на свету, в то время как внесение АТФ не оказывает существенных изменений. Видимо, в данных условиях ингибирующий эффект АТФ не проявляется, возможно, из-за нарушения соотношения между концентрациями АТФ и эндогенных субстратов гликолиза, содержание которых увеличивается при поступлении экзогенной глюкозы. Можно допустить, что добавление АДФ снимает аденилатный блок фосфофруктокиназы и пируваткиназы, что приводит к накоплению пирувата.

Известно, что ингибитором гликолиза на уровне фосфофруктокиназы и пируваткиназы является цитрат, регулирующий пропускную способность гликолиза, а значит, и содержание пирувата. При введении экзогенной лимонной кислоты обнаружено увеличение ПВК на свету. Подобная закономерность характерна при использовании других субстратов цик-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ла Кребса — малата и сукцината (рис. 1). Высокое содержание пирувата свидетельствует либо об активном образовании его, либо о замедленном использовании в последующих реакциях, Возможно, что экзогенные кислоты, попадая в митохондрию, вовлекаются в цикл Кребса и, тем самым, способствуют накоплению эндогенной ПВК. Также следует учитывать, что пути образования пировиноградной кислоты много-

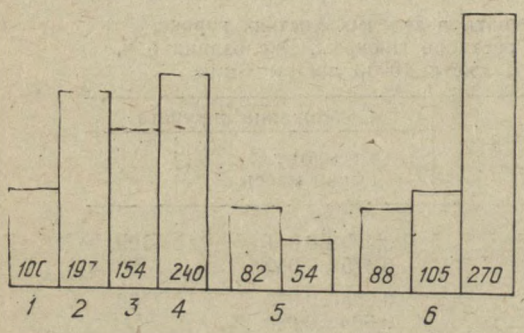


Рис. 1. Содержание пирувата (в %) в зеленых листья гороха: *1* — в темноте; *2* — на свету на цитрате; *3* — на свету на малате; *4* — на свету на сукцинате; *5* — изменение в темноте и на свету при введении NaF; *6* — введение на свету АТФ, диурона и ФГК соответственно

образны и могут осуществляться за счет реакций фотосинтеза. Однако фторид натрия, добавленный к цитрату, ингибирует образование ПВК как на свету, так и в темноте. Внесение АТФ не вызывает существенных изменений в содержании пировиноградной кислоты в зеленых листьях гороха на свету. Не наблюдается количественных изменений в содержании пирувата и при использовании диурона — ингибитора нециклического фотофосфорилирования. При добавлении ФГК уровень ПВК на свету возрастает, что может быть связано с субстратным активированием конечных реакций гликолиза. Полученные результаты показывают, что при разных метаболических нагрузках экзогенными субстратами в зеленых листьях растений на свету возможно функционирование гликолиза.

Исследования, проведенные с проростками ячменя в условиях гипоксии, показали увеличение содержания пировиноградной кислоты в зеленых листьях на свету на 20—25%, что может быть связано с функционированием гликолиза. Введение фторида натрия вызывает уменьшение содержания пирувата в зеленых проростках, находящихся как в темноте, так и на свету (табл. 3). Ингибирующий эффект NaF отчетливо проявляется при изучении содержания ПВК в зонах роста развивающегося листа ячменя как в гетеротрофных меристе-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Таблица 3

Действие фторида натрия (0,05 М) на содержание пирувата в 7-дневных листьях ячменя. Экспозиция 3 ч, интенсивность света 40000 эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$

Условия опыта	Содержание пирувата, мкМ/г сырой массы	
	H_2O	NaF
В темноте	0,324±0,02	0,111±0,066
На свету	0,414±0,048	0,237±0,081

Таблица 4

Влияние фторида натрия (0,05 м) на содержание пирувата в зонах роста 7-дневного листа ячменя. Экспозиция 3 ч, интенсивность света 40000 эрг·см$^{-2}$·см$^{-1}$

Условия опыта	Содержание пирувата в зонах, мкМ/г сырой массы		
	Деление	Растяжение	Дифференцированные клетки
H_2O	0,250±0,045	0,212±0,017	0,331±0,040
NaF	0,176±0,026	0,186±0,015	0,192±0,028

матических и растягивающихся клетках, так и в зоне автотрофных дифференцированных тканей (табл. 4).

Таким образом, полученные результаты приводят к выводу о том, что при определенных условиях существует возможность функционирования гликолиза в зеленых листьях растений на свету.

ЛИТЕРАТУРА

1. Филиппова Л. А., Мамушина Н. С., Заленский О. В. О функционировании основных этапов темпового дыхания во время фотосинтеза. — Ботанический журнал, 1982, т. 67, № 9, с. 1169.

2. Williams M., Randall D. D. Pyruvate dehydrogenase complex from chloroplasts of Pisum sativum L. — Plant Physiol., 1979, v. 64, p. 1099.

3. Либберт Э. Физиология растений. — М.: Мир, 1976. — 580 с.

4. Singh P., Naik M. S. Effect of photosynthesis on dark mitochondrial respiration in green cells. — FEBS Letters, 1984, v. 165, N 2, p. 145.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

5. Верхотурова Г. С., Астафурова Т. П. О направлении некоторых реакций цикла Кребса в зеленых листьях на свету. — Физиология растений, 1983, т. 30, вып. 3, с. 580.

6. Верхотурова Г. С., Астафурова Т. П., Шрагер Л. Н. Влияние света на активность некоторых ферментов и содержание пирувата в различных клеточных структурах зеленых листьев гороха. — В кн.: Оперативные информационные материалы. Иркутск, 1981, с. 21.

7. Stitt M., Lilli R., Heldt H. W. Adenine nucleotide levels in the cytosol, chloroplasts and mitochondria of wheat leaf protoplasts. — Plant physiol., 1982, v. 70, N 4, p. 971.

8. Степанова А. М., Шумилова А. А. Исследование функционирования гликолитического пути окисления глюкозы в зеленых листьях на свету. — Биохимия, 1974, т. 39, вып. 5, с. 929.

9. Верхотурова Г. С., Астафурова Т. П. Изучение функционирования гликолитического пути дыхания на свету в листьях фасоли. — В кн.: Вопросы биологии. Томск.: Изд-во Том. ун-та, 1978, с. 77.

10. Филиппова Л. А., Мамушина Н. С., Зубкова Е. К., Мирославов Е. А., Кудинова Л. И. Взаимоотношения фотосинтеза и дыхания ассимилирующих клеток в разных зонах растущего листа ячменя. — Физиология растений, 1986, т. 33, вып. 1, с. 66.

11. Киселева И. С., Некрасова Г. Ф. Действие ингибиторов белкового синтеза на рибулезодифосфаткарбоксилазу в разных зонах листа ячменя. — В кн.: Фотосинтетический метаболизм углерода. Свердловск: Изд-во Ур. ун-та, 1983, с. 95.

12. Солдатенков С. В., Мазурова Т. А. Анализ органических кислот растений методом ионного обмена и хроматографии на бумаге. — В кн.: Биохимические методы в физиологии растений. М., 1971, с.

13. Белозерова Л. С., Левитина Т. П. Определение пировиноградной кислоты модифицированным методом Фридемана и Хаугена. — В кн.: Методы биохимического анализа растений. Л.: Изд-во Лен. ун-та, 1978, с. 129.

14. Окунцов М. М., Фролова Н. М. Зависимость проницаемости протоплазмы от ассимиляционного аппарата. — В кн.: Вопросы фотосинтеза, 1970, вып. 2, с. 73.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ВЛИЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ НА КИНЕТИКУ ФОТОХИМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ХЛОРОПЛАСТОВ

В. М. Иванченко, М. И. Маршакова,
С. А. Микульская, Л. В. Обуховская

Институт экспериментальной ботаники АН БССР

Нами обнаружено, что in vitro митохондрии подавляют фотохимическую активность (реакцию Хилла с $K_3Fe(CN)_6$) хлоропластов [1], а также фотофосфорилирование [2]. Хлоропласты, в свою очередь, ингибируют окислительное фосфорилирование в митохондриях и активируют их АТФ-азную активность. В настоящей работе представлены результаты дальнейших исследований in vitro влияния митохондрий на фотохимическую активность изолированных хлоропластов.

Методика

Объектом исследования служили хлоропласты, выделенные из листьев 7—12-дневных проростков гороха или ячменя. Митохондрии выделялись из корней тех же проростков либо из этиолированных листьев ячменя. Методы, а также среды выделения и инкубации общепринятые [1, 2]. Митохондрии выделялись и ресуспендировались в той же среде, что и хлоропласты, вводились в реакционную смесь либо непосредственно перед освещением, либо заблаговременно. В последнем случае совместная предынкубация органелл проводилась в темноте без кофакторов электронного транспорта и фосфорилирования. Кофакторы вводились в инкубационную смесь непосредственно перед освещением. Скорость восстановления хлоропластами 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) определяли на ФЭКН-57, $K_3Fe(CN)_6$ — на СФ-26. Интенсивность конденсированного белого актиничного света, пропущенного через водный фильтр, указана при описании конкретных результатов опытов. Время экспозиции при определении скорости реакции Хилла с феррицианидом — 3 мин, фотофосфорилирования — 6 мин. О скорости фотофосфорилирования судили по убыли $P_н$ (неорганического фосфата). $P_н$ определяли по

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

методу Аллена в модификации Чеснокова и сотрудников [3].

Белки из органелл выделяли с помощью охлажденного ацетона [4]. Водорастворимые белки извлекали из ацетонового порошка белков четырехкратным промыванием навески дистиллированной водой в стеклянном гомогенизаторе по 30 мин и последующим освобождением от нерастворимого осадка центрифугированием при 10 000 g. Для опытов белки концентрировали упариванием объединенных промывных вод при комнатной температуре. Диализ осуществляли против дистиллированной воды. Содержание белка определяли по методу Лоури в модификации Хартри [5], содержание хлорофилла — по Арнону [6].

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены результаты исследования влияния митохондрий на скорость восстановления феррицианида и скорость фотофосфорилирования с ФМС. Из них следует, что в присутствии митохондрий скорость обеих реакций снижается.

При исследовании таких сложных систем важно убедиться, что наблюдаемый результат есть следствие именно снижения функциональной активности хлоропластов, а не обусловлен протеканием параллельно обратных процессов или кон-

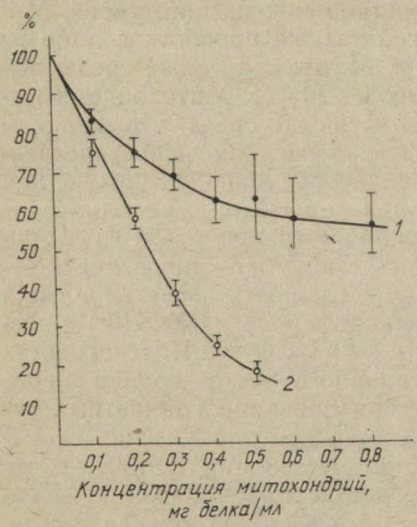


Рис. 1. Влияние возрастающих концентраций митохондрий на скорость восстановления хлоропластами гороха феррицианида (*1*) и фотофосфорилирования с ФМС (*2*) (% от контроля); I=260 Вт/м²

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

куренцией за субстрат. Другими словами, следует иметь в виду возможность того, что восстановленный феррицианид может реокисляться митохондриями и образованный ими в процессе фотофосфорилирования АТФ гидролизоваться АТФ-азой митохондрий. Кроме того, в митохондриях содержится много высокоактивной аденилаткиназы, следовательно, возможна конкуренция со стороны митохондрий за АДФ.

Поэтому в наших опытах темновая (контрольная) проба фиксировалась одновременно с остановкой реакции в световой (опытной) пробе с тем, чтобы вычесть влияние на конечный результат опыта каких-либо независимых от света реакций, если таковые протекают в реакционной смеси. С этой же целью были выполнены опыты с предварительной темновой предынкубацией хлоропластов совместно с митохондриями. Предынкубация велась при комнатной температуре и в отсутствие кофакторов электронного транспорта и фотофосфорили-

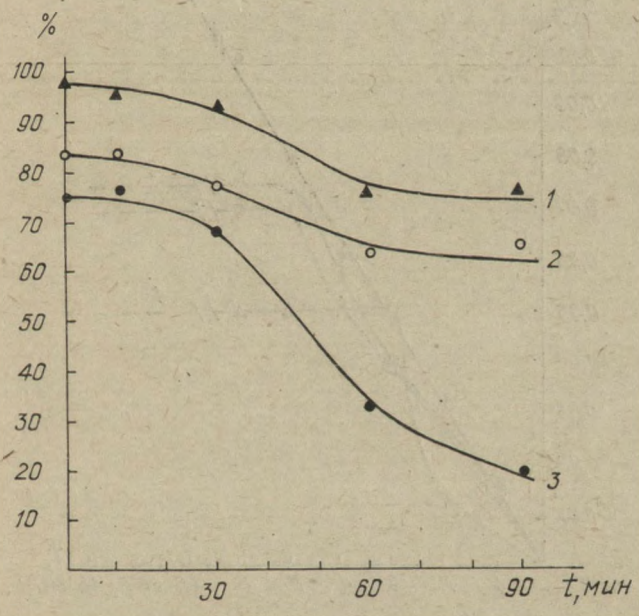


Рис. 2. Зависимость скорости восстановления хлоропластами гороха феррицианида (*1*) и фотофосфорилирования (*2*, *3*) от времени предынкубации хлоропластов с митохондриями. Концентрации митохондрий: *1* — 0,05, *2* — 0,125, *3* — 0,250 мг белка/мл; I = 260 Вт/м²

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

рования. Как видно из рис. 2, с увеличением времени предынкубации влияние митохондрий на фотохимическую активность хлоропластов растет, причем растет нелинейно, быстрее увеличиваясь в интервале 30—60 мин. И хотя механизм такой кинетики пока неясен, факт усиления отрицательного влияния митохондрий на фотохимическую активность хлоропластов с увеличением времени совместной предынкубации в отсутствие кофакторов фотофосфорилирования позволяет предполагать, что это влияние не обусловлено конкуренцией между двумя видами органелл за субстрат (АДФ). Однако и здесь не исключается возможность того, что предынкубация хлоропласт-

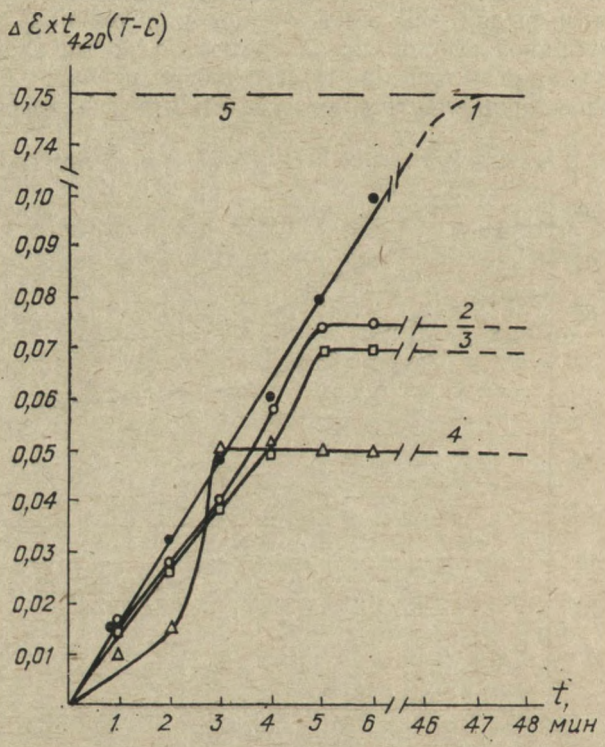


Рис. 3. Кинетика восстановления хлоропластами гороха (10 мкг хл/мл) $K_3Fe(CN)_6$ в отсутствие (*1*) и в присутствии митохондрий (0,5 мг белка/мл). Предынкубация 30 (*2*), 60 (*3*) и 90 мин (*4*); 5 — Ext_{420} темновой пробы; I=260 Вт/м²; *T* — темнота, *C* — свет

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

тов с митохондриями стимулирует у последних процессы, обратные тем, которые хлоропласты осуществляют на свету, что может выглядеть как их ингибирование. На самом же деле это отражало бы влияние хлоропластов на митохондрии, что не менее интересно.

Для понимания этих вопросов существенную информацию можно получить, исследуя кинетику интересующих нас процессов.

Из рис. 3 видно, что присутствующие в реакционной смеси митохондрии придают существенные особенности кинетике восстановления хлоропластами феррицианида. Кривая восстановления феррицианида в этом случае характеризуется лагфазой в начальном периоде. Затем через 2—3 мин реакция активируется, достигая (и даже иногда превышая) скорости реакции в контрольном варианте, а затем кинетическая кривая резко выходит на плато так, как будто реакция полностью останавливается. Время выхода кривой на плато, а следовательно высота плато, уменьшаются с увеличением времени темновой предынкубации хлоропластов совместно с митохондриями.

Кинетические кривые восстановления ДХФИФ хлоропластами (рис. 4) в присутствии митохондрий несколько отличаются от кривых восстановления феррицианида. На интенсивном свету здесь отсутствует лагфаза. Она появляется только на слабом свету и при времени предынкубации 30 и более минут. Однако и здесь высота плато кривых снижается с увеличением времени предынкубации хлоропластов с митохондриями, причем на слабом свету это происходит примерно в два раза быстрее. В последнем случае и лагфаза длится существенно дольше.

Кинетика этерификации хлоропластами $P_н$ (рис. 5) в процессе фотофосфорилирования в присутствии митохондрий очень схожа с кинетикой восстановления ими красителей, особенно феррицианида. Здесь у кривых также имеется лагфаза. Ее продолжительность лежит в пределах двух минут и для ее проявления необходимо минимальное время пребывания хлоропластов в смеси с митохондриями, равное одной минуте (рис. 6). При введении митохондрий в реакционную смесь непосредственно перед освещением (опыт без предварительной инкубации) ингибирование процесса начинает проявляться (лагфаза) спустя одну минуту после начала освещения. Это критическое время можно рассматривать как минимальное время, необходимое для проникновения некоего действующего начала из митохондрий в хлоропласты. Равновесное распре-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

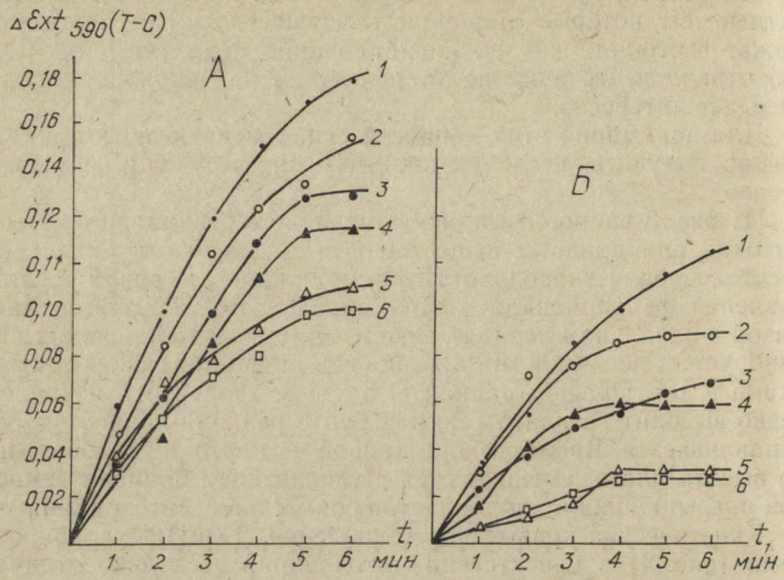


Рис. 4. Кинетика восстановления ДХФИФ хлоропластами гороха (5 мкг хл/мл) в отсутствие (*1*) и в присутствии митохондрий (0,5 мг белка/мл). Предынкубация 0 (*2*), 10 (*3*), 30 (*4*), 60 (*5*) и 90 мин (6); *А* — *I*=260 Вт/м²; *В* — *I*=8,0 Вт/м²

деление этого действующего начала между средой и хлоропластами, по-видимому, осуществляется в среднем в пределах 30 мин, поскольку лагпериод с увеличением времени предынкубации не превышает 30 мин (см. рис. 4, 5), хотя, возможно, это время зависит от интенсивности освещения (рис. 4).

Характер кинетических кривых и особенно увеличение скорости фотохимических реакций после некоторого лагпериода говорит в пользу того, что эти кривые характеризуют ход прямых фотохимических процессов в хлоропластах, а не равновесное состояние между последними и противоположно направленными процессами, протекающими с участием митохондрий. Последнее могло бы определять наличие и высоту плато, однако маловероятно, что обратные реакции включаются так резко, как резко фаза активации на кинетических кривых сменяется фотостационарной, и их скорость в дальнейшем практически не изменяется. Маловероятно также, что кинетика реокисления восстановленного красителя и гидролиза

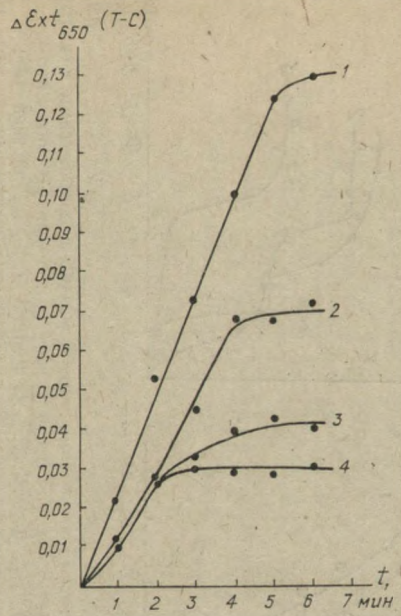


Рис. 5. Кинетика этерификации $P_н$ хлоропластами гороха (50 мкг хл/мл) в отсутствие (*1*) и в присутствии митохондрий (0,2 мг белка/мл) с предынкубацией 30 (*2*), 60 (*3*) и 90 мин (*4*); I=260 Вт/м²

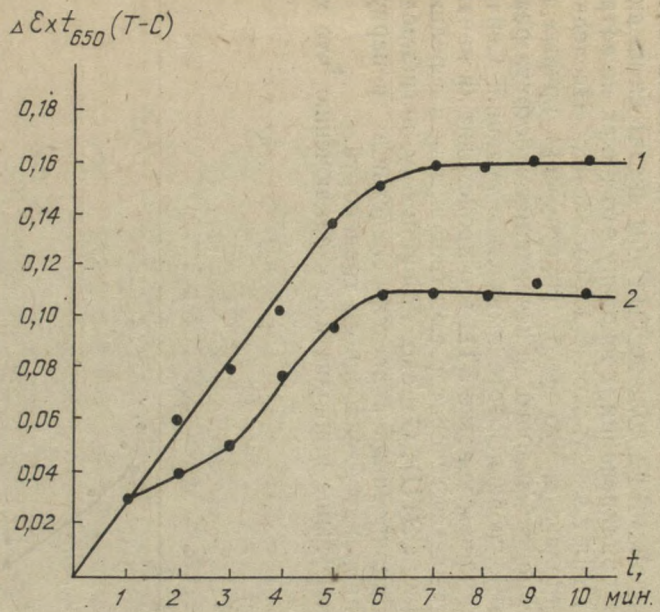


Рис. 6. Кинетика этерификации $P_н$ хлоропластами гороха (50 мкг хл/мл) в отсутствие (*1*) и в присутствии митохондрий (0,4 мг белка/мл) без предынкубации (*2*); I=260 Вт/м²

Digital Library (repository) of Tomsk State University http://vital.lib.tsu.ru

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

АТФ митохондриями окажутся идентичными. К тому же реокисление кофакторов фотосинтетического транспорта электронов митохондриями не должно было бы сказаться на скорости фотофосфорилирования, поскольку это никак не затрагивало бы транспорт электронов в хлоропластах. Последнее позволяет предполагать, что выход кинетических кривых на стационарный уровень задолго до исчерпания субстрата реакции отражает выключение фотохимических реакций. Сейчас пока неясно, на каком участке ЭТЦ это происходит (в начале ее, когда выключается генератор электронов, или в середине, когда прерывается ЭТЦ). Однако, по-видимому, ингибирование фотофосфорилирования является следствием в первую очередь ингибирования электронного транспорта.

Все сказанное выше приводит нас к заключению, что ха-

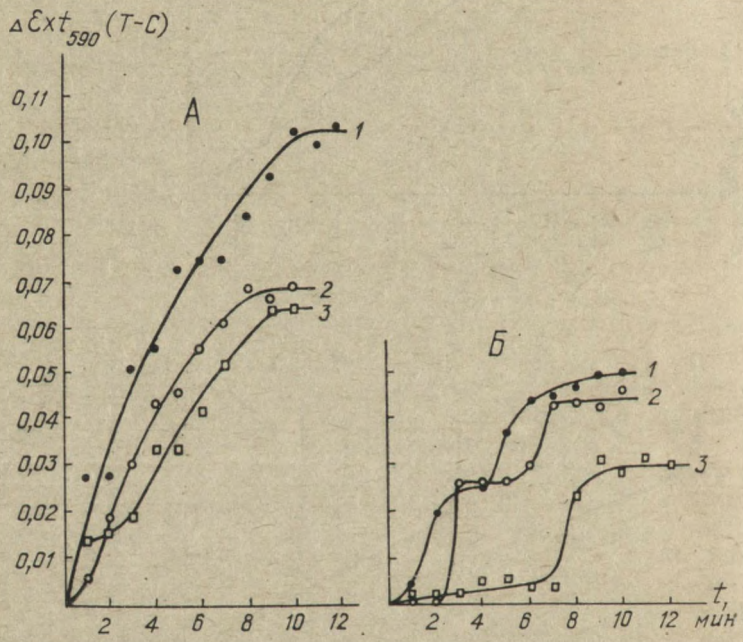


Рис. 7. Кинетика восстановления ДХФИФ хлоропластами ячменя (10 мкг хл/мл) в отсутствие (*1*) и в присутствии митохондрий (0,5 мг белка/мл) из корней (*2*) и листьев (*3*); *А* — без предынкубации; *Б* — предынкубация 60 мин; *I* = =8,0 Вт/м²

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

рактер кинетических кривых фотохимической активности хлоропластов отражает особенности протекания именно фотохимических реакций в хлоропластах, обусловленные присутствием в системе митохондрий.

На рис. 7, 8 представлены данные, свидетельствующие, что митохондрии, выделенные из этиолированных листьев проростков ячменя, действуют на фотохимическую активность хлоро-

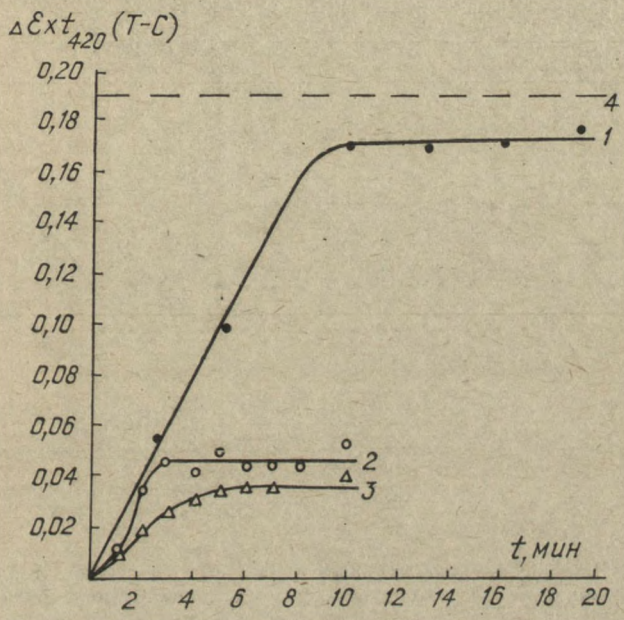


Рис. 8. Кинетика восстановления $K_3Fe(CN)_6$ хлоропластами ячменя (10 мкг хл/мл) в отсутствие (*1*) и в присутствии митохондрий (0,5 мг белка/мл) из корней (*2*) и листьев (*3*); *4* — Ext_{420} темновой пробы; предынкубация 30 мин; 1 = 260 Вт/м²

пластов так же (или даже несколько сильнее), чем митохондрии, выделенные из корней. Этот факт имеет определенное значение для допущения, что обсуждаемое взаимодействие между органеллами может иметь место in vivo.

В следующем опыте хлоропласты предынкубировались по 30 мин отдельно с митохондриями и с надосадочной жидкостью, полученной после осаждения 15 мин при 10 000 g такого

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

же количества митохондрий, предварительно выдержанных в среде выделения 30 мин (рис. 9). Тот факт, что митохондрии существенно сильнее подавляют фотохимическую активность хлоропластов, чем супернатант, позволяет высказать предположение, что для взаимодействия органелл важным является их непосредственный контакт друг с другом. Возможно, что при таком контакте индуцируется дополнительный выход эффектора из митохондрий. Если предположить, что это являет-

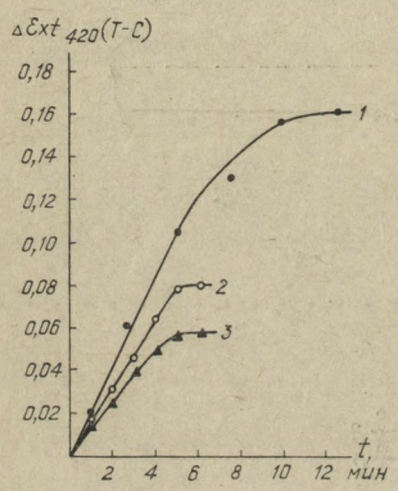


Рис. 9. Влияние на кинетику восстановления $K_3Fe(CN)_6$ хлоропластами ячменя (10 мкг хл/мл) митохондрий (0,5 мг белка/мл) (*3*) и супернатанта после осаждения такого же количества митохондрий (2); контроль — *1*; I=260 Вт/м²

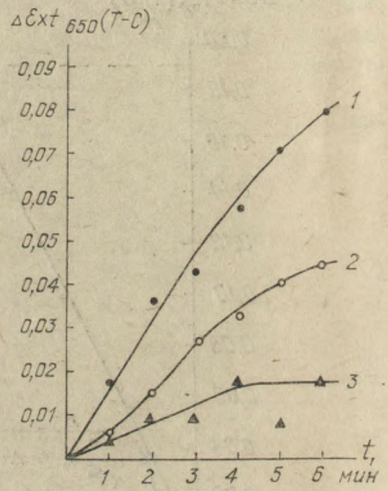


Рис. 10. Кинетика этерификации $P_н$ хлоропластами гороха (50 мкг хл/мл) в отсутствие (*1*) и в присутствии суммарной водорастворимой фракции белков митохондрий (0,08 мг/мл), подвергнутой (*2*) и неподвергнутой диализу (*3*); I=260 Вт/м²

ся биологически предопределенным, тогда, возможно, это также указывает на наличие такого взаимодействия между хлоропластами и митохондриями in vivo. С другой стороны, наличие активности в супернатанте указывает на то, что взаимодействие органелл in vitro носит химический характер и что медиатор этого взаимодействия является водорастворимым. Последнее послужило основанием для исследования на

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

активность гидрофильных веществ органелл, в частности белков.

Как видно из рис. 10, суммарная фракция водорастворимых белков митохондрий действует на фотофосфорилирование совершенно идентично действию целых митохондрий. Это, по-видимому, также можно рассматривать как важный аргумент в пользу того, что и в случае целых митохондрий наблюдаемая кинетика исследуемых реакций отражает только особенности их протекания в хлоропластах, а вклад обратных реакций с участием митохондрий не является существенным, даже если он и имеется. Часть водорастворимой фракции белков, которая была подвергнута диализу, оказалась менее активной, чем часть, не подвергнутая диализу. Причины этого предстоит исследовать. Данные, представленные на последнем рисунке, показывают, что медиатором взаимодействия между хлоропластами и митохондриями, по-видимому, являются водорастворимые белки. Это их свойство — водорастворимость — является весьма существенным для возможности их быть медиаторами взаимодействия органелл in vivo, так как облегчает их перенос в протоплазме между органеллами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванченко В. М., Маршакова М. И., Микульская С. А. Влияние митохондрий на фотохимическую активность хлоропластов in vitro. — ДАН БССР, 1986, т. 30, № 3, с. 277.

2. Иванченко В. М., Маршакова М. И., Урбанович Т. А. и др. Влияние хлоропластов и митохондрий на энерготрансформирующие функции друг друга in vitro. — ДАН СССР, 1986, т. 291, № 2, с. 505—508.

3. Никулина Г. Н. Обзор методов колориметрического определения фосфора по образованию «молибденовой сини». — М.: Наука, 1965. — 44 с.

4. Техника биохимического исследования субклеточных структур и биополимеров. — М.: Наука и техника, 1977. — 152 с.

5. Hartree E. F. Determination of protein: A modification of the Loury method that gives a linear photometric response. — Anal. Biochem., 1972, v. 48, N 2, p. 422.

6. Arnon D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts in Beta vulgaris. — Plant. Physiol., 1949, v. 24, N 1, p. 1.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ВЛИЯНИЕ СВЕТА НА СИСТЕМУ АДЕНИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ В МИТОХОНДРИЯХ ЯЧМЕНЯ

О. А. Роньжина, Е. Б. Кравченко

Калининградский государственный университет

В процессе энергообеспечения живого организма адениловой системе принадлежит центральная роль. К настоящему времени выяснено положительное влияние светового фактора на процессы фотофосфорилирования в хлоропластах. Зависимость окислительного фосфорилирования в митохондриях растений от света остается менее изученной [6]. В литературе отсутствует единое мнение по этому вопросу, хотя большинство авторов считает, что окислительное фосфорилирование ингибируется на свету [1, 2]. В то же время известно, что реакция митохондрий на воздействие внешних факторов может быть различной in vitro и in vivo [3].

Целью данной работы явилось исследование образования аденилатов в митохондриях под влиянием света. Опыты проводились с 5—6-дневными этиолированными растениями ячменя (Hordeum sativum), которые освещались в течение различного времени (20 мин, 1, 6 и 12 ч) люминисцентными лампами (интенсивность света 20 000 эрг·см^2/с). Контрольные растения находились в темноте. После освещения из опытных, а также из темновых контрольных растений выделялись митохондрии [4]. В выделенных клеточных органоидах определялось содержание адениновых нуклеотидов и их предшественников (аденозина и аденина) методом бумажной хроматографии [5]. Оптическую плотность нуклеотидов измеряли спектрофотометрически при 260 нм.

Полученные данные (см. таблицу) показали, что уже при 20-минутном освещении растений происходят энергетические изменения в митохондриях. В них уровень АТФ повышается на 30,76%, а АДФ — на 41,30%. Одновременно происходит понижение уровня АМФ, аденозина и аденина. Это свидетельствует об использовании данных предшественников на биосинтез макроэргических соединений на свету.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Содержание адениновых нуклеотидов в митохондриях этиолированных растений ячменя, мкг/г сухой массы

Условия опыта	АТФ	АДФ	АМФ	$A_з$	A_d
Контроль (темнота)	312,05	329,65	300,35	301,82	210,50
Свет 20 мин	408,04	465,81	264,25	283,63	198,35
Свет 1 ч	507,35	522,60	287,00	320,00	182,04
Контроль (темнота)	324,00	351,42	244,80	238,00	190,45
Свет 6 ч	403,02	428,65	298,76	202,04	127,05
Контроль	295,20	324,80	214,40	288,00	178,30
Свет 12 ч	264,55	389,05	368,80	216,57	168,85

При более продолжительном освещении растений в течение 1 и 6 ч наблюдается дальнейшее увеличение пула аденилатов в митохондриях. Наряду с возрастанием количества АТФ отмечается также значительное увеличение АДФ. Шестичасовое освещение растений повышает содержание аденилатов уже гораздо в меньшей степени. Так, если за 1 ч световой экспозиции количество АТФ в митохондриях возросло на 62,59% по сравнению с контролем, то к 6 ч — только на 24,38%. Дальнейшее увеличение световой экспозиции до 12 ч приводит к тому, что количество АТФ в митохондриях становится даже меньше темнового контроля. Однако содержание АДФ и АМФ при этом возрастает, а $A_з$ и A_d — уменьшается. Это дает основание считать, что при относительно длительной световой экспозиции растений образованная в митохондриях АТФ не накапливается в этих органоидах, а происходит активное утилизирование ее энергии на нужды клетки. Таким образом, пул аденилатов в митохондриях регулируется светом. На основании полученных результатов можно предполагать, что возрастание уровня АТФ в митохондриях на свету обусловлено синтезом АТФ в самих митохондриях [7].

ЛИТЕРАТУРА

1. Заленский О. В. Исследование связи между дыханием и фотосинтезом листьев растений. — Изв. АН СССР. Сер. биол., 1961, № 2, с. 202.

2. Simonis H. W. Untersuchungen zur Photosynthese — Phosphorylierung an intakten Algenzellen. — Berichte der Deutschen Bot., 1964, v. 77, L—L, s. 513.

3. Семихатова О. А. Методы оценки энергетической эффективности дыхания растений. — Л.: Наука, 1967. — 207 с.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

4. Калинин Ф. Л., Пельтек Ч. М. Окисне фосфорилювання в мітохондріях проростків ячменю в присутів гібереліну A_3. — Изв. АН УССР, 1968, с. 201.

5. Окунцов М. М., Врублевская К. Г., Зайцева Т. А. Количественное определение аденозинфосфатов в растениях методом бумажной хроматографии. — В кн.: Специальный практикум по биохимии и физиологии растений. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1966, с. 3.

6. Мамушина Н. С., Филиппова Л. А., Заленский О. В. Взаимодействие фотосинтетического и дыхательного метаболизма углерода на свету и в темноте в ассимилирующей клетке. — В кн.: Метаболические пути и их регуляция в фотосинтезе: Тезисы докладов всесоюзного совещания. Пущино, 1981, с. 36.

7. Stitt Mark, Lilley Ross Mc C., Heldt Hans W. Adenine nucleotide levels in the cytosol, chloroplasts, and mitochondria of wheat leaf protoplasts. — Plant Physiol., 1982, v. 70, N 4, p. 971.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ДЫХАНИЕ В ПРОЦЕССЕ ЗЕЛЕНЕНИЯ И ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРЕМАЛЬНОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ

Т. Д. Романова

Институт биологии КФ АН СССР

Зеленение этиолированных проростков сопровождается глубокой перестройкой всего клеточного метаболизма. Наиболее значительные изменения происходят во взаимоотношении двух генерирующих энергию систем клетки — фотосинтеза и дыхания [9, 10]. Наблюдается постепенный переход от дыхательного источника энергии, характерного для этиолированных растений, к фотосинтетическому, свойственному для зеленого листа с полностью сформированным фотосинтетическим аппаратом. Этот переход сопровождается подавлением дыхания и существенными изменениями его реакций.

При подавлении фотосинтеза высокой температурой возрастает роль дыхания как поставщика энергии, необходимой для репарации повреждений [2]. При этом наблюдаются увеличение интенсивности дыхания и изменения в цепи реакций дыхания, способствующие более успешной генерации энергии.

В предлагаемой статье рассматриваются изменения дыхания, гликолиза, реакций цикла Кребса, работы электрон-транспортной цепи в процессе формирования фотосинтетического аппарата и после повреждения фотосинтеза экстремальной температурой.

Методика

Этиолированные 8—10-дневные проростки яровой пшеницы Московская-35 выращивали в темноте на водопроводной воде при 25 °С. На разных этапах зеленения (12, 24 ч), а также этиолированные и зеленые проростки прогревали в течение 2 ч при 48 °С. Прогреву подвергали целые растения, корневая система которых была погружена в воду. Дыхание и фотосинтез определяли манометрическим методом [7].

Для изучения работы отдельных звеньев цепи реакций дыхания использовали метод специфических ингибиторов [3].

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

О функционировании гликолиза судили по подавлению дыхания фторидом натрия ($2{,}5 \cdot 10^{-2}$ М), цикла Кребса — по подавлению малонатом ($5 \cdot 10^{-2}$ М). Для блокирования переноса электронов на участке НАДН→$ФП_1$ ЭТЦ митохондрий использовали амитал ($3 \cdot 10^{-3}$ М), на участке цит. в→цит. с — антимицин А ($2{,}5 \cdot 10^{-5}$ М). Для ингибирования цитохромоксидазы применяли цианистый калий ($5 \cdot 10^{-3}$ М). О сопряжении окисления с фосфорилированием судили по влиянию на дыхание 2,4-ДНФ. Ингибиторы инфильтрировали в центрифуге при 500g в течение 1 мин. В качестве контроля инфильтрировали воду. Концентрации и pH ингибиторов устанавливали экспериментально. Полученные данные статистически обработаны.

Результаты и обсуждения

Происходящие по мере формирования фотосинтетического аппарата изменения темнового дыхания носят не только количественный, но и качественный характер, т. е. касаются изменения направленности некоторых этапов цепи реакций дыхания. В этиолированных проростках и в самом начале зеленения, когда активность фотосинтеза невелика (табл. 1), отмечается достаточно высокая интенсивность дыхания и всех звеньев цепи реакций дыхания (рис. 1). Это вызвано возросшими потребностями организма в энергии для роста и биогенеза хлоропластов. По мере зеленения постепенно снижается интенсивность дыхания и изменяется активность отдельных его компонентов, отмечается подавление гликолиза. У зеленых проростков доля гликолиза почти в два раза меньше, чем у этиолированных. Меньше изменяется работа цикла Кребса. Такая ситуация возможна, если в цикл Кребса поступают промежуточные продукты фотосинтеза [5]. Образующиеся в цикл Кребса восстановленные пиридиннуклеотиды, по-видимому, не окисляются в ЭТЦ митохондрий зеленых растений, как в этиолированных растениях на ранних стадиях зеленения. Вероятно, часть восстановленных нуклеотидов и промежуточных продуктов цикла Кребса используются в биосинтезах, стимулируемых в зеленеющих проростках светом (синтез липидов, белков).

Постепенное переключение с дыхательного на фотосинтетический источник энергии в процессе зеленения сопровождается подавлением работы электрон-транспортной цепи митохондрий. Это выражается в ослаблении ингибирующего эффекта амитала, антимицина А и цианида на дыхание (табл. 2).

Таблица 1

Изменение фотосинтеза и дыхания по мере зеленения и после действия экстремальной температуры (48 °С, 2 ч), мкл O_2/г сырой массы · ч

Условия опыта	Время зеленения, ч					
	0	4	12	24	48	зеленые
Фотосинтез, 25 °С	—	1611±125	2704±81	4757±147	5919±149	5551±94
Фотосинтез, 48 °С	—	604±18	1185±13	2371±57	2792±47	2974±62
% подавления	—	—62,59	—56,12	—50,16	—49,42	—46,43
Дыхание, 25 °С	610±10	777±24	619±21	555±20	415±9	280±3
Дыхание, 48 °С	527±36	528±6,9	591±33	701±17	505±2,5	411±2
% подавления	—14	—19	—5	+26	+21	+46

Таблица 2

Влияние ингибиторов ЭТЦ митохондрии на дыхание, мкл O_2/г сырой массы · ч

Условия опыта	°С	Вода		Амитал		Антимицин		Цианид	
		мкл.	%	мкл.	%	мкл.	%	мкл.	%
Этиолированные	25°	398±14	100	287±7	—28	248±12	—38	214±13	—46
проростки	48°	349±11	100	280±7	—20	105±11	—70	160±14	—54
Зеленение,	25°	486±22	100	415±14	—15	468±15	—4	321±14	—38
12 ч	48°	505±46	100	481±23	—5	303±20	—40	162±13	—68
Зеленение,	25°	438±11	100	367±19	—16	427±16	—2	342±18	—22
24 ч	48°	560±46	100	500±22	—11	238±17	—57	215±19	—62
Зеленые	25°	394±30	100	340±27	—14	498±33	+26	467±31	+18
проростки	48°	546±18	100	531±17	—3	208±60	—62	210±12	—61

Digital Library (repository) of Tomsk State University http://vital.lib.tsu.ru

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

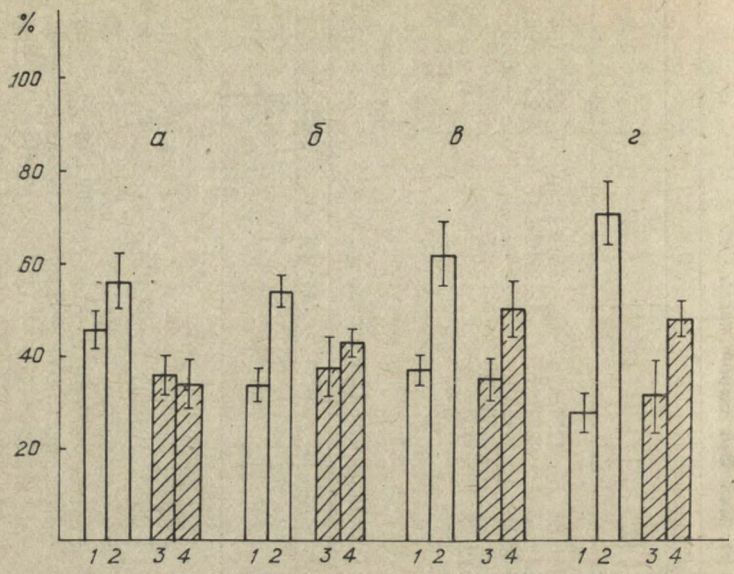


Рис. 1. Влияние фторида и малоната на поглощение кислорода в процессе зеленения проростков пшеницы и после действия температуры (48 °С, 2 ч): *а* — этиолированные проростки; *б* — зеленение 12 ч, *в* — зеленение 24 ч; *г* — зеленые проростки; *1* — фторид, контроль, 25 °С; *2* — фторид, прогрев, 48 °С, 2 ч; *3* — малонат. контроль 25 °С; *4* — малонат, прогрев, 48 °С 2 ч

На заключительных стадиях зеленения наблюдается стимуляция дыхания под влиянием антимицина А, что, по-видимому, связано с его разобщающим действием [1].

По мере формирования фотосинтетического аппарата усиливается устойчивость дыхания к цианиду. Считают, что период высокой устойчивости к цианиду связан с максимумом синтетической активности [11] и высоким содержанием углеводов [8]. Относительно физиологической роли цианидрезистентного пути еще нет окончательно сложившегося мнения. Одна из возможных его функций состоит в удалении избытка углеводов [12], другая — в удалении избытка восстановителя [13].

Наиболее высокая степень сопряжения окисления с фосфорилированием отмечается в первые часы зеленения, т. е. когда активность реакций фотосинтетического фосфорилирования невелика, а потребности в энергии, связанные с биогенезом хлоропластов, довольно значительные. По мере акти-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

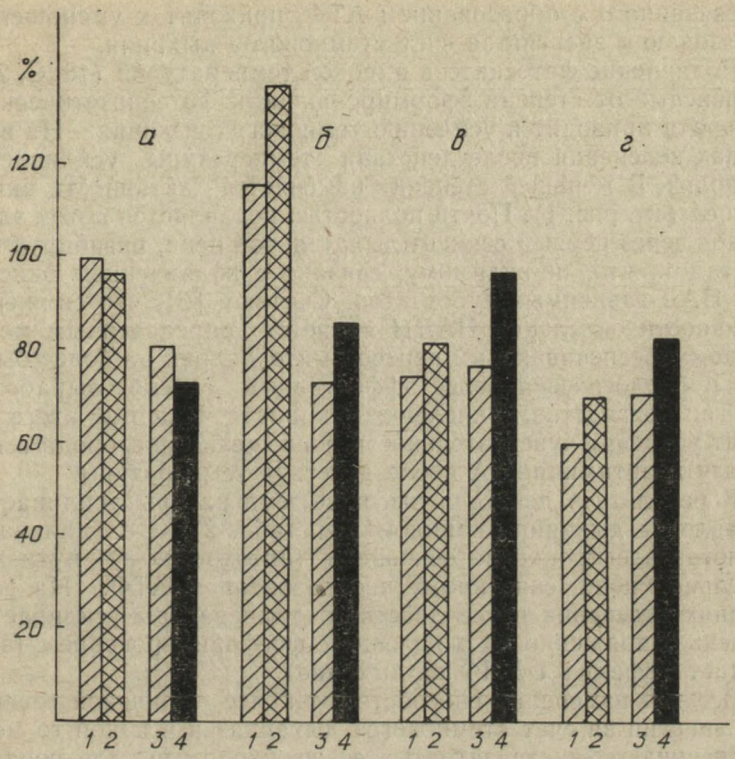


Рис. 2. Влияние 2,4-ДНФ на поглощение кислорода в процессе зеленения и после действия температуры (48 °С, 2 ч): *а* — этиолированные проростки; *б* — зеленение 4 ч; *в* — зеленение 24 ч; *г* — зеленые проростки; *1* — инфильтрация воды; *2* — 2,4-ДНФ; *3* — вода (48 °С); *4* — 2,4-ДНФ (48 °С)

вации фотосинтеза эффект ДНФ на дыхание снижается (рис. 2).

Итак, в процессе зеленения наблюдается постепенное «подавление дыхания фотосинтезом», по-видимому, подобное имеющее место в зеленом листе на свету. В этой ситуации «...большую часть работы в клетке берет на себя фотосинтез, а на долю дыхания остается меньше работы, что неизбежно приведет к его торможению» [4, с. 44]. Подавление гликолиза, снижение скорости транспорта электронов по ЭТЦ митохондрий, усиление альтернативного цианидрезистентного пути,

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

не связанного с образованием АТФ, приводят к уменьшению образования энергии за счет «темнового» дыхания.

Подавление фотосинтеза высокой температурой (48 °С, 2 ч) независимо от степени сформированности фотосинтетического аппарата приводит к усилению темнового дыхания. На всех этапах зеленения после действия температуры усиливается гликолиз. В меньшей степени изменяется активность цикла Кребса (см. рис. 1). Почти полностью подавляется поток электронов через первый сегмент дыхательной цепи, ингибируемый амиталом, что, по-видимому, связано с подавлением окисления НАД-зависимых субстратов. Считают [6], что снижение активности окисления НАДН является определенным механизмом, обеспечивающим перевод митохондрий на более быстрый и биологически более эффективный способ выработки энергии посредством окисления сукцината. В пользу этого говорит усиление чувствительности поглощения кислорода к малонату и антимицину А после действия температуры.

В результате действия высокой температуры усиливается подавление дыхания цианидом (см. табл. 2), т. е. усиливается поток электронов по основному (цитохромному) пути дыхательной цепи, связанному с образованием АТФ. На всех стадиях зеленения после действия температуры усиливается степень сопряженности окисления с фосфорилированием (возрастает эффект 2,4-ДНФ на дыхание).

Все эти изменения способствуют более успешной генерации энергии за счет «темнового» дыхания и в какой-то мере обеспечивают «экстразатраты» ее, необходимые для репарации повреждений, вызванных действием высокой температуры.

Таким образом, взаимоотношения дыхания и фотосинтеза обусловлены состоянием фотосинтетического аппарата и зависят от температурных условий. Взаимозаменяемость основных энергетических генераторов направлена на поддержание энергетического гомеостаза клетки и обеспечивает ее устойчивость к экстремальным условиям среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акименко А. П., Меденцев А. Т. Изучение причины появления цианидрезистентного дыхания у дрожжей. — Биохимия, 1980, т. 45, № 8. с. 1433—1437.

2. Альтергот В. Ф., Мордкович С. С. Физиолого-биохимические закономерности устойчивости растений Сибири к неблагоприятным условиям среды и пути повышения продуктивности сельскохозяйственных культур. — Сельхоз. биология, 1980, т. 15, № 2, с. 247—253.

3. Гордон Л. Х., Алексеева В. Я. и др. Изменение дыхатель-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ного обмена и ультраструктуры клеток корней пшеницы при обезвоживании.— Физиология растений, 1975, т. 22, № 5, с. 918.

4. Заленский О. В. Эколого-физиологические аспекты изучения фотосинтеза: XXXVII Тимирязевские чтения. — Л.: Наука, 1977. — 56 с.

5. Заленский О. В., Зубкова Е. К. и др. К вопросу о взаимоотношениях фотосинтеза и дыхания в ассимилирующей клетке. I. Исследование гликолиза и цикла Кребса на свету и в темноте в клетках хлореллы. — Бот. журн., 1980, т. 70, № 9, с. 1241.

6. Кондрашева М. Н. Накопление и использование янтарной кислоты в митохондриях. — В кн.: Митохондрии. Молекулярные механизмы ферментативных реакций. М.: Наука, 1969, с. 151.

7. Семихатова О. А., Чулановская М. В. Манометрические методы изучения дыхания и фотосинтеза растений. М.; Л.: Наука, 1965.— 196 с.

8. Azcon Bieto Y., Lambers H., Day D. Effect of the photosynthesis and carbohydrate status on respiratory rates and involment of the alternative yathway in leaf respiration. — Plant Physiol. 1983, v. 72, p. 598.

9. De-Greef L. A., Verbelen Y. P. Plastids development in etiolated bean leaves under uncoupling conditions of ozidative phosphorylation.— Ann. Bot. 1977, v. 46, p. 1371.

10. Hampp R. Kinetics of Mitochondrial Phosphate Transport and Rates of Respiration and Phosphorylation During Greening of etiolated Avena Leaves. — Planta, 1979, c. 144, p. 325.

11. Horn M., Mertz D. Cyanide resistant respiraton in syspension cultured cells of Nicotiana glutinosa. — Plant Physiol. 1982, v. 69, p. 1439.

12. Lambers H., Day D. A. Azcone-Bieto J. Cyanide-resistant respiration in root and leaves. Measurement with intact tissues and isolated mitochondria. — Plant Physiol. 1983, v. 58, p. 148.

13. Lambers H., Smakman J. Respiration of the Roots of Flood-Intolerant and Flood — Tolerant senecio Affinity for oxygen and Resistance to cyanide. — Physiol. Plant. 1978, v. 42, p. 163.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ПОДАВЛЕНИЕ ДЫХАНИЯ СВЕТОМ У МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Ю. И. Маслов, И. В. Евдокимова

Биологический научно-исследовательский институт
при Ленинградском университете

Взаимосвязь фотосинтеза и дыхания в фотосинтезирующих организмах определяет продуктивные свойства растений и в сравнительном плане отражает этапы эволюции растительной клетки. Фотосинтез и дыхание как биохимические процессы имеют общие промежуточные продукты (пиридиновые и флавиновые нуклеотиды, аденозинфосфаты, некоторые органические кислоты), субстраты (кислород, органические соединения), а возможно, и сходные ферментативные комплексы (например, некоторые участки цепи переноса электронов). Исследование связи фотосинтеза и дыхания наталкивается на ряд трудностей, связанных с одновременным прохождением разнонаправленных реакций на свету. Так, образование в ходе фотосинтеза кислорода и лабильных первичных продуктов должно способствовать усилению дыхания на свету. С другой стороны, фотосинтез и дыхание могут обнаружить конкуренцию по отношению к донорам и акцепторам электронов и энергии.

Диурон (дихлорфенилдиметилмочевина) является специфическим ингибитором фотосинтетического выделения кислорода и в концентрации порядка 10^{-6} М полностью подавляет автотрофный рост микроводорослей и растений [1, 2]. В указанной концентрации диурон лишь незначительно сказывается на активности темнового дыхания и I фотосистемы фотосинтеза. Можно предполагать, что при полном подавлении фотосинтетического выделения кислорода (II фотосистемы фотосинтеза) диуроном могут быть выявлены другие стороны взаимодействия фотосинтеза и дыхания.

Целью настоящей работы было изучение действия света на поглощение кислорода клетками водорослей, в которых фотосинтетическое выделение кислорода полностью подавлено диуроном.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Материалы и методы

В работе использованы 2 штамма цианобактерий: Anabaena variabilis № 458 и № 787 и Euglena gracilis (штамм Z). Водоросли выращивали при искусственном освещении лампами ЛДЦ-80 в модифицированных сосудах ИФР (освещенность у поверхности сосуда около 3000 лк) в минеральных средах (для E. gracilis — с добавлением витаминов B_1 и B_{12}). Диурон добавлялся в среду выращивания в концентрации $0{,}25 \cdot 10^{-7}$ М.

В конце линейной фазы роста водоросли осаждали и промывали средой выращивания для удаления диурона (контрольные варианты подвергали такой же обработке). Суспензию водорослей помещали в ячейку полярографа с датчиком pO_2 и измеряли поглощение или выделение кислорода в темноте и на свету (100000 лк) при медленном добавлении диурона до тех пор, пока добавление его не переставало оказывать действие на газообмен по O_2. Подачу диурона прекращали, отмечали скорость поглощения кислорода на свету; затем свет выключали и отмечали скорость темнового поглощения кислорода (рис. 1).

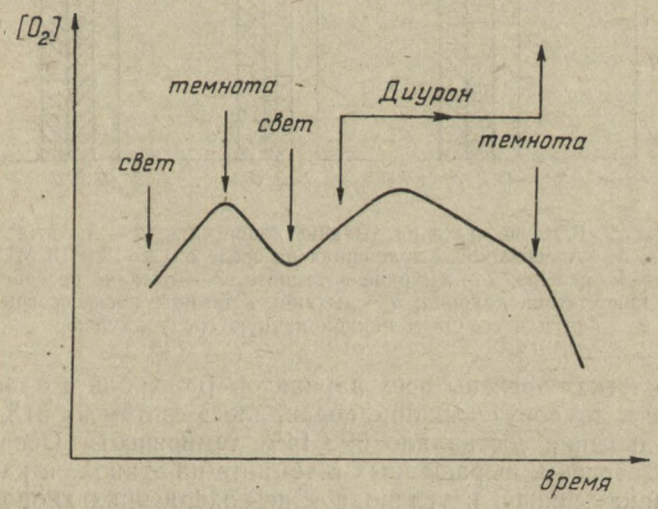


Рис. 1. Типичная кривая определения газообмена кислорода в экспериментах

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Результаты и обсуждение

В указанных условиях освещение насыщающей интенсивности частично подавляет дыхательное поглощение кислорода. Объединенные данные для обоих штаммов цианобактерий, выращенных без диурона (рис. 2, *а*, контроль), показывают, что среднее подавление дыхания светом составляет 64% (дыхание на свету равно 36% дыхания в темноте). В клетках анабены, выращенных в присутствии сублетальных концентраций диурона (рис. 2, *б*), дыхание на свету в среднем составило 40% темнового дыхания. Следовательно, адаптация водорослей к диурону, установленная ранее [3], не приводит к изменению степени подавления дыхания светом.

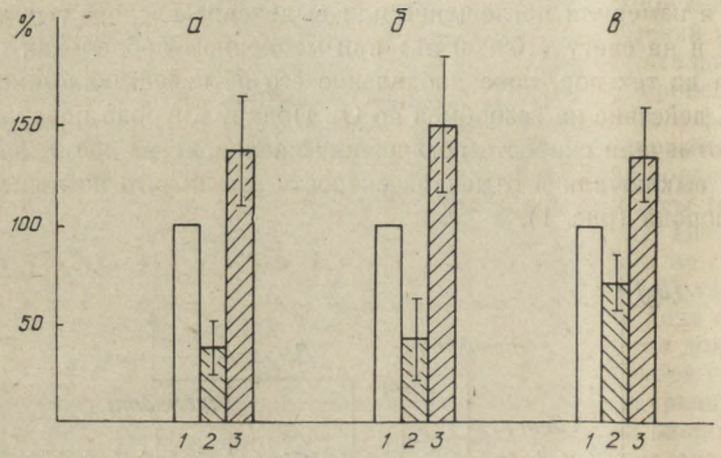


Рис. 2. Влияние света на дыхание водорослей: *а* — A. variabilis; *б* — A. variabilis. выращенная на среде с $0{,}25 \cdot 10^{-7}$ DCMU; *в* — E. gracilis; *1* — дыхание в темноте; *2* — дыхание на свету в присутствии диурона; *3* — дыхание в темноте после освещения и внесения в инкубационную среду диурона

В клетках эвглены всех вариантов (контроль и адаптированные к диурону) дыхание подавлялось светом на 31% (световое дыхание составляло 69±14% темнового). Освещение клеток эвглены, выращенных в темноте на этаноле в качестве источника энергии и углерода и не содержащих хлорофилла и хлоропластов, не приводит к снижению скорости поглощения кислорода. Поэтому можно предположить, что наблюдае-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

мое нами подавление дыхания светом связано с активностью фотосинтетического аппарата, т. е. I фотосистемы фотосинтеза, которая не ингибируется диуроном и в отсутствие активности II фотосистемы может осуществлять циклическое фотофосфорилирование.

В заключение следует отметить, что у цианобактерий подавление дыхания светом выражено сильнее, чем у эукариотической эвглены. Это может быть связано с тем, что, по некоторым данным [4—7], фотосинтетическая и дыхательная цепи переноса электронов у цианобактерий локализованы на одной мембране и, таким образом, конкурируют за какие-то компоненты (это могут быть электроны, пластохинон, АДФ). В клетках эукариотических организмов (эвглена) фотосинтетический и дыхательный механизмы пространственно разобщены и располагают собственными пулами интермедиатов и кофакторов. Однако и в этом случае наблюдается достоверное подавление дыхания светом (в присутствии диурона); механизм такого взаимодействия не ясен и подлежит дальнейшему изучению. Факт увеличения интенсивности темнового дыхания после небольшого периода освещения (даже в присутствии диурона, см. рис. 2) свидетельствует о накоплении в клетках лабильных продуктов фотосинтетических реакций. Одним из путей дальнейшего исследования механизма подавления светом является изучение этих лабильных продуктов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Avron M., Neuman J. Photophosphorylation in chloroplasts. — Ann. Rev. Plant. Physiol., 1968, v. 19, p. 137.

2. Bendall D., Hill R. Haem-protein in photosynthesis. — Ann. Rev. Plant. Physiol., 1968, v. 19, p. 167.

3. Андреев В. П., Маслов Ю. И. Адаптация к диурону пигментных структур Anabaena variabilis и Cyanidium caldarium. — Физиол. и биохимия культ. растений, 1985, т. 17, № 3, с. 293.

4. Codd G. A., Sallal A.-K. J. Glycollate oxidation by thylakoids of the cyanobacteria Anabaena cylindrica, Nostoc muscorum and Chlorogloea fritschii. — Planta, 1978, v. 132, N 2, p. 177.

5. Smith L., Ramirez J. Formation of ATF in intact cells of Rhodospirillum rubrum on oxygenation or illumination. — Fed. Proc., 1965, v. 24, N 2, p. 609.

6. Peschek G. A. Light inhibition of respiration and fermentation and its reversal by inhibition and uncouplers of photophosphorylation in whole cells of a prokariotic alga Anacystis nidulans, — Proc. 3-d Int. Congr. Photos., Rehovot, 1974, v. 2, p. 921.

7. Mullinaux C. W., Allen J. F. The state 2 transition in the cyanobacterium Synechococcus G301 can be driven by respiratory electron flow into the plastoquinone pool. — FEBS Letters, 1986, v. 205, N 1, p. 155.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ФЕРМЕНТЫ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ И ГЛИОКСИЛАТНОГО ШУНТА ЦИАНОБАКТЕРИИ СПИРУЛИНА

И. В. Терехова, И. И. Чернядьев, Н. Г. Доман

Институт биохимии АН СССР

В литературе довольно мало сведений о функционировании цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и глиоксилатного шунта у цианобактерий, а имеющиеся касаются, главным образом активности малатдегидрогеназы. Исследование всех ферментов ЦТК и глиоксилатного шунта проведено только у Anabaena variabilis [1]. Как известно, цианобактерии весьма разнообразны морфологически и хорошо приспосабливаются к различным экологическим условиям, что дает основание предполагать функционирование в них довольно пластичного метаболизма. Поэтому исследование представителей класса цианобактерий, являющегося вершиной биохимической эволюции автотрофных прокариот [2], могло бы обнаружить специфические особенности ферментов, что необходимо как с точки зрения эволюции, так и в связи с различными проблемами практического значения, такими, как промышленное получение пищевого и кормового белка из микроводорослей, ликвидация массового развития цианобактерий при цветении водоемов, создание замкнутых экологических систем на основе жизнедеятельности низших микроорганизмов.

В нашей работе представлены данные по определению удельной активности и некоторых особенностей ряда ферментов ЦТК и глиоксилатного шунта у гормогониевой цианобактерии Spirulina platensis, которая по ряду показателей (продуктивность, количество белка и его аминокислотный состав и т. д.) признана перспективным объектом промышленного фотосинтеза [3]. В предварительных опытах были подобраны оптимальные значения pH реакционных смесей и концентрации и соотношения компонентов среды.

Аконитат-гидратаза спирулины обладала довольно высокой активностью (таблица), однако была нестабильна в бесклеточном препарате. Для сохранения активности в реакци-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Активность ферментов спирулины

Фермент	Уд. активность, нмоль/мин·мг белка
Аконитат-гидратаза	347,6±80,2
НАДФ-изоцитратдегидрогеназа	109,5±3,4
НАД-изоцитратдегидрогеназа	Не обнаружена
α-кетоглутаратдегидрогеназа	Не обнаружена
Сукцинил-КоА-синтетаза	
АТФ-зависимая	5,9±0,1
ГТФ-зависимая	1,1±0,1
Фумарат-гидратаза	266,6±28,3
НАД-малатдегидрогеназа	134,6±2,9
НАДФ-малатдегидрогеназа	9,6±1,6
Изоцитрат-лиаза	27,7±0,4
НАДН-дегидрогеназа	16,5±2,1
НАДФН-дегидрогеназа	14,5±1,3

онной смеси необходимо присутствие цистеина (1 мМ) и хлористого натрия (50 мМ) в качестве стабилизирующих добавок.

Изоцитратдегидрогеназа спирулины, как и других цианобактерий, была специфична к НАДФ. Добавление к реакционной смеси для определения активности фермента 0,7 мМ АДФ или АМФ не влияло на скорость реакции. В литературе отмечено как ингибирование фермента цианобактерий сходными концентрациями АДФ [4, 5], так и отсутствие влияния последнего на изоцитратдегидрогеназу [1]. Фермент был более активен с Mg^{2+}, чем с Mn^{2+}. НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа не была обнаружена в широком интервале значений pH, несмотря на наличие в реакционной смеси АМФ, обычно активирующего этот фермент у микроорганизмов.

Нам не удалось также выявить активность α-кетоглутаратдегидрогеназной системы спирулины при различных значениях pH реакционной смеси и при изменении концентрации α-кетоглутарата от 0,5 до 7,5 мМ и КоА от 0,02 до 0,1 мМ ни с НАД, ни с НАДФ, хотя она была показана нами с использованием той же методики на бесклеточном препарате микроорганизма Endomyces magnusii. Добавление в реакционную смесь тиаминпирофосфата (20 мМ), рибофлавина и липоевой кислоты (5 мМ) — кофакторов окислительного декарбоксилирования — также не выявило активности фермента. В литературе установилось мнение о разомкнутости ЦТК на участ-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ке α-кетоглутаратдегидрогеназы. Однако необходимо отметить данные по включению метки из ацетата в аспартат и глутамат, которые послужили основанием для утверждения, что у Chlorogloea fritschii ЦТК функционирует полностью [6]. На это указывает также способность некоторых цианобактерий к усвоению и окисление α-кетоглутарата [7].

В метаболизме изоцитрата у спирулины принимала также участие изоцитрат-лиаза (ключевой фермент глиоксилатного шунта), активность которой, как и активность НАДФ-изоцитратдегидрогеназы, была выше с Mg, чем с Mn. Более низкая по сравнению с НАДФ-изоцитратдегидрогеназой активность изоцитрат-лиазы указывает на преобладание реакции синтеза α-кетоглутарата над превращением изоцитрата в сукцинат.

Нам удалось показать у спирулины двумя способами (спектрофотометрически и калориметрически) наличие сукцинил-КоА-синтетазы, активность которой не была обнаружена у A. variabilis и Anacystis nidulans [1]. В полностью функционирующем ЦТК фермент катализирует реакцию синтеза АТФ или ГТФ из неорганического фосфата и соответствующего нуклеозиддифосфата в присутствии сукцинил-КоА и Mg^{2+}. Однако реакция легко обратима, поэтому можно предполагать, что у спирулины из-за отсутствия α-кетоглутаратдегидрогеназной системы фосфорилирование на уровне субстрата как подсобный энергетический механизм отсутствует, но в реакции, идущей в обратном направлении, при затрате энергии макроэргической связи нуклеозидтрифосфата образуется сукцинил-КоА. Это предположение косвенно подтвердилось исследованием неуклеотидной специфичности фермента. Сукцинил-КоА-синтетаза спирулины проявляли более высокую удельную активность в присутствии АТФ, наиболее универсального источника энергии, который образуется в освещенных клетках бактерий в процессе фотофосфорилирования [2]. Активность фермента с ГТФ составляла 20% от активности с АТФ.

Фумарат-гидратаза спирулины активировалась поливалентным анионом фосфата. Добавление хлористого магния до концентрации 0,01 М не увеличивало активность фермента

Активность НАД-зависимой малатдегидрогеназы была значительно выше активности НАДФ-зависимого фермента (см. таблицу). Эти ферменты отличались по оптимуму pH.

У спирулины показана активность как НАДФН-, так и НАДН-дегидрогеназы, которые оказались сравнительно не-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

высокими (таблица) и приблизительно равными между собой. Это, вероятно, связано с синтезом обоих никотинамидаденинди-нуклеотидов в реакциях ЦТК спирулины (изоцитрат- и малатдегидрогеназная реакция).

Полученные нами результаты свидетельствуют об общем довольно высоком уровне потенциальной активности ферментов ЦТК и изоцитрат-лиазы при выращивании спирулины на свету. Интенсивность функционирования ЦТК в значительной мере определяет интенсивность процессов биосинтеза [8], и таким образом обнаруженные в результате наших исследований биохимические показатели отражают высокую биопродуктивность спирулины. Исследованные ферменты были близки между собой по активности, хотя в литературе есть указание на окисление изоцитрата как на наиболее медленный этап ЦТК [9]. У спирулины наиболее низкой активностью обладала сукцинил-КоА-синтетаза, однако ее активность сопоставима с активностью изоцитрат-лиазы, поставляющей субстрат для этой реакции. Учитывая потребность клетки в синтезе хромофорных тетрапиррольных групп для хлорофилла «а» и фикоцианина, нельзя исключить возможность действия и других путей их синтеза [1, 10].

Таким образом, ЦТК спирулины разомкнут на уровне α-кетоглутаратдегидрогеназы и играет ограниченную роль в генерации энергии, выполняя в основном биосинтетические функции. Окислительная ветвь ЦТК ведет к двум конечным продуктам — α-кетоглутарату и через глиоксилатный шунт и сукцинил-КоА-синтетазу — к сукцинил-КоА. Функционирование другой ветви ЦТК тесно связано с действием «малик»-энзимов и фосфоенолпируват-карбоксилазы [11] и определяется требованиями биосинтеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pearse J., Leach C. K., Carr N. G. The incomplete tricarboxylic acid cycle in the blue-green alga Anabaena variabilis. — J. Gen. Microbiol., 1969, v. 55, N 3, p. 371.

2. Гусев М. В., Никитина К. А. Цианобактерии. Физиология и метаболизм. — М.: Наука, 1979. — 227 с.

3. Ciferri O. Spirulina, the edible microorganism. — Microbiol. rev., 1983, v. 47, N 4, p. 551.

4. Friga G. M., Farkas G. L. Isolation and properties of an isocitrate dehydrogenase from Anacystis nidulans. — Arch. Microbiol., 1981, v. 129, N 5, p. 331.

5. Papen H., Neuer G., Refaian M., Bothe H. The iscitrate dehydrogenase from cyanobacteria. — Arch. Microbiol., 1983, v. 134, N 1, p. 73.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

6. Miller J. S., Allen M. M. Carbon utilization patterns in the heterotrophic blue-green alga Chlorogloea fritschii. — Arch. Microbiol., 1972, v. 86, N 1, p. 1.

7. Судьина Е. Г., Шнюкова Е. И., Костлан Н. В. и др. Биохимия сине-зеленых водорослей. — Киев: Наукова думка, 1978. — 262 с.

8. Гулый М. Ф., Мельничук Д. А. Роль углекислоты в регуляции обмена веществ у гетеротрофных организмов. — Киев: Наукова думка, 1978. — 243 с.

9. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). /Под ред. Прохоровой М. И. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. — 272 с.

10. Avissar Y. 5-aminolevulinate synthesis in permeabilized filaments of the blue-green alga Anabaena variabilis. — Plant Physiol., 1983, v. 72, N 1, p. 200.

11. Терехова И. В., Чернядьев И. И., Горонкова О. И. и др. Спирулина: характеристика и возможная регуляция путей фотосинтетической ассимиляции углерода. — В кн.: Роль низших организмов в круговороте веществ в замкнутых экологических системах. Киев: Наукова думка, 1979, с. 327.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

К ВОПРОСУ О РЕГУЛЯЦИИ НАКОПЛЕНИЯ ЩАВЕЛЕВОЙ КИСЛОТЫ В ЛИСТЬЯХ C_3-РАСТЕНИЯ

И. М. Магомедов, Зо Ин Бу

Биологический научно-исследовательский институт
при Ленинградском университете

Щавелевая кислота, относящаяся к дикарбоновым кислотам, встречается во многих растениях. Выяснение регулирования ее содержания является актуальной задачей, так как некоторые заболевания человека, например мочекаменная болезнь, связаны с длительным употреблением растений, особенно овощей, содержащих большие количества щавелевой кислоты (шпинат, свекла). В последнее время эта проблема привлекает внимание специалистов, работающих в области питания, токсикологии и диетологии (особенно в странах, где значительную долю питания населения составляют овощи, содержащие оксалаты).

Мы поставили перед собой задачу выяснить пути образования щавелевой кислоты и возможности регулирования накопления ее в листьях шпината и свеклы — ценных пищевых C_3-культур.

Объекты и методика исследований

Объектами исследования служили растения, богатые щавелевой кислотой: шпинат Spinacia Oleracea L. сорта Nobel, выращенный из семян урожая 1977 г., полученных с Дагестанской опытной станции ВИРа, и столовая свекла сорта Каньнам I, полученная из семян 1980 г. производства Пхеньянского овощного института. Растения выращивались в сосудах в смеси песок : керамзит в соотношении 1 : 1. В летний период растения культивировались в вегетационном домике на опытном участке, в зимний — в камерах КВР-1.

Для исследования влияния форм минерального азота на изменение содержания щавелевой кислоты растения выращивали на нитратном и аммонийном растворе. В качестве нитратного питания использовался полный питательный раствор,

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

содержащий NO_3 153,2 г/л, а аммонийного питания — раствор, содержащий NH_4 в количестве 153,2 г/л [1].

Содержание щавелевой кислоты определяли по общепринятой методике [2]. Суммарное количество органических кислот устанавливали титрованием раствора 0,02 н $Ba(OH)_2$. Для выяснения механизма образования щавелевой кислоты на свету и в темноте использовали $^{14}CO_2$, ^{14}C-гликолевую и ^{14}C-лимонную кислоты. Для проведения опытов с ^{14}C специальным сверлом из листьев вырезали диски, которые затем настилали на дистиллированную воду в чашки Петри, последние помещали в герметичные камеры из органического стекла и выставляли на свет (25000 лк). В течение 5, 30, 60 мин через камеры пропускали $^{14}CO_2$ при температуре 27—29°. Для определения исходной радиоактивности часть материала фиксировали 80% этиловым спиртом, а другую часть из камеры помещали в темноту на 6 ч для выяснения роли интермедиатов цикла Кребса в образовании щавелевой кислоты. Для ингибирования цикла Кребса использовали 100 мМ раствор малоната натрия. С целью выяснения роли фотодыхания в накоплении оксалатов часть дисков освещали в течение 6 ч. Поглощение $^{14}CO_2$, выделенной дисками, осуществлялось 30% NaOH. Фиксацию листьев производили 80% кипящим этанолом. Органические кислоты разделяли по принятой методике [3]. Радиоактивность образцов измеряли на сцинтилляционном счетчике LS-Beckman, повторность опытов 3-кратная.

Результаты и обсуждение

Основной задачей исследований явилось определение путей торможения накопления щавелевой кислоты в листьях шпината и столовой свеклы. На первом этапе работы необходимо было выяснить изменение содержания данной кислоты в листьях шпината с 5-, а в листьях свеклы с 3-дневного возраста. Выбор таких сроков связан с необходимостью получения минимального количества листьев для анализа растений. Исследования проводили на листьях растений, выращенных на двух различных источниках азота в питательной среде (NO_3 и NH_4). Полученные данные представлены на рис. 1, из которого видно, что в ходе онтогенеза листьев шпината и свеклы содержание щавелевой кислоты постепенно увеличивается. На нитратном питании у шпината скорость накопления оксалатов повышается, начиная с 25-го дня, и резко возрастает с 35-го по 45-й день, после чего происходит некоторый

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

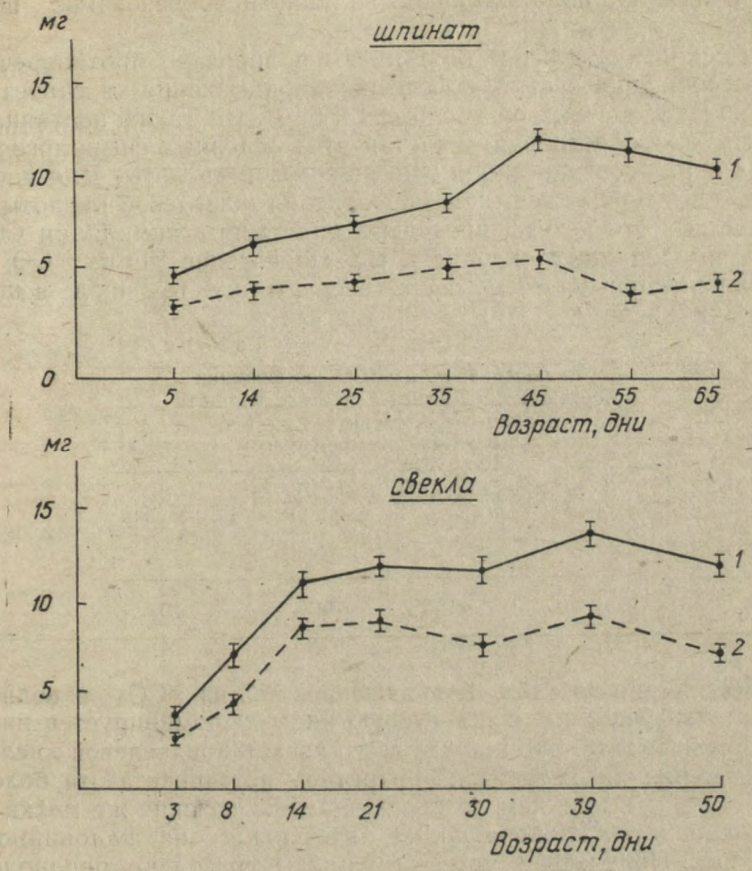


Рис. 1. Динамика образования щавелевой кислоты в ходе онтогенеза листа шпината и свеклы: *1* — NO_3^-; *2* — NH_4^+

спад содержания кислоты. В листьях свеклы скорость накопления щавелевой кислоты возрастает с 3-го по 14-й день и на нитратном, и на аммонийном питании, причем в зрелых листьях происходит снижение темпа накопления кислоты. Образование щавелевой кислоты в листьях свеклы наиболее интенсивно идет на раннем этапе развития, в то время как у шпината максимум накопления сдвинут на более поздние сроки. Сравнение нитратного и аммонийного вариантов показывает, что именно нитратное питание, особенно у шпина-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

та, оказывает положительное влияние на образование щавелевой кислоты.

Поскольку в литературе имеются довольно противоречивые сообщения о вкладе фотосинтеза и дыхания в синтез и накопление щавелевой кислоты [4, 5, 6], мы также поставили опыты для определения участия этих основных физиологических процессов в метаболизме щавелевой кислоты. Для того, чтобы выяснить масштабы образования щавелевой кислоты в процессе фотосинтеза, проведены опыты по ассимиляции CO_2 листьями шпината и определено включение ^{14}C из $^{14}CO_2$ в различные органические вещества листьев, в том числе в щавелевую кислоту.

Таблица 1

Включение ^{14}C из $^{14}CO_2$ во фракции органических веществ листьев шпината в процессе фотосинтеза за 1 ч, имп/мин·10^3·г сырой массы

Условия опыта	Общий водно-спиртовый экстракт листьев	Фракция аминокислот	Щавелевая кислота
NO_3	4140	130	29
NH_4	3660	170	4

Как видно из табл. 1, включение ^{14}C из $^{14}CO_2$ в водно-спиртовый экстракт и щавелевую кислоту доминирует в нитратном варианте. Это прежде всего касается щавелевой кислоты, содержание которой на нитратном источнике азота более чем в 7 раз выше, чем на аммиачном. Включение же метки в аминокислоты, наоборот, идет интенсивнее на аммонийном питании. Полученные нами результаты позволяют предположить, что в листьях шпината в процессе фотосинтеза осуществляется, вероятно, обратная взаимосвязь между синтезом щавелевой кислоты и аминокислотами.

Далее мы попытались выяснить, является ли щавелевая кислота первичным продуктом фотосинтеза. Результаты опытов с 5-минутной экспозицией на свету листьев шпината показали, что ^{14}C не включается в щавелевую кислоту, хотя при этом наблюдается значительное количество ^{14}C в гликолевой кислоте. При 30-минутной экспозиции листьев в атмосфере $^{14}CO_2$ ^{14}C поступает и в щавелевую кислоту. Эти результаты показывают, что щавелевая кислота не относится к первичным продуктам ассимиляции углекислоты.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Из литературных данных известно, что щавелевая кислота возникает из гликолевой, образуемой при фотодыхании [6, 7]. Поэтому следующим этапом работы явилось исследование метаболизма ^{14}C-гликолевой кислоты в высечках из листьев шпината и свеклы в связи с выяснением ее участия в образовании щавелевой кислоты (табл. 2). На свету ^{14}C-гликолат поступает в высечки листьев почти в 2 раза интенсивнее, чем в темноте. Однако при выражении в процентах поступление ^{14}C в щавелевую кислоту на свету и в темноте не различается. Это указывает на то, что при наличии исходного субстрата образования щавелевой кислоты, например гликолата, биосинтез оксалата на свету и в темноте идет с одинаковой скоростью, хотя это наблюдается не всегда.

Таблица 2

Образование щавелевой кислоты из ^{14}C-гликолевой кислоты в высечках из листьев шпината и свеклы на свету и в темноте за 4 ч, имп/мин·10^3·г сырой массы

Условия опыта	Водно-спиртовый экстракт	Аминокислоты		Щавелевая кислота	
		имп/мин	%*	имп/мин	%*
Шпинат					
Свет	135±2,5	29±1,2	21	10±0,2	7
Темнота	65±2,0	16±1,1	25	5±0,2	8
Свекла					
Свет	109±2,7	24±1,3	22	11±1,0	10
Темнота	59±1,9	12±1,1	20	4±0,2	7

* % водно-спиртового экстракта.

С целью выяснения роли фотодыхания в синтезе оксалата были поставлены опыты с ингибиторами углеродного метаболизма на свету. Как известно, при фотодыхании гликолевая кислота образуется при распаде 1,5-рибулезобисфосфата при участии РБФК-О. Оксигеназную функцию этого фермента ингибирует повышенная концентрация CO_2, в результате чего происходит снижение синтеза гликолата [8]. В качестве ингибитора мы использовали 100 мМ $NaHCO_3$, поскольку насыщающей концентрацией РБФК-О является 50 мМ $NaHCO_3$ [9]. Оказалось, что при выдерживании в течение 6 ч на свету высечек из листьев шпината на 100 мМ $NaHCO_3$ включение ^{14}C в оксалат снижается на 40%.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Источником щавелевой кислоты в темноте могут быть интермедиаты цикла Кребса [10]. При использовании 100 мМ малоната как ингибитора цикла Кребса было установлено, что поступление ^{14}C в оксалат подавляется на 15—17%. Это указывает на участие цикла Кребса в образовании предшественника оксалата, что соответствует литературным данным [10, 11]. Известно, что щавелевая кислота может синтезироваться и в глиоксилатном цикле. При этом изоцитрат, образующийся в цикле Кребса, превращается с помощью изоцитратлиазы в глиоксилевую и янтарную кислоты, первая из которых в дальнейшем окисляется до щавелевой [11].

Таким образом, можно заключить, что источником образования щавелевой кислоты является гликолевая, но происхождение последней на свету связано с фотодыханием, а в темноте — с глиоксилатным циклом.

Каким образом снизить содержание щавелевой кислоты в листьях растений, не снижая при этом количество общей биомассы? Оказалось, что мощным регулятором накопления щавелевой кислоты является источник азота в питательной среде (см. рис. 1). Очевидно, что общее содержание оксалатов в течение вегетации в листьях шпината и свеклы заметно выше при нитратном питании, чем аммонийном. Вместе с тем известно, что растения лучше растут на нитратном источнике азота, чем на аммонийном. Для получения хорошего урожая с пониженным содержанием оксалатов мы решили сначала выращивать растения на нитратном питательном растворе (30 дней), а затем переводить их на аммонийное питание. При этом в одной серии опытов периодически измеряли содержание только щавелевой кислоты (рис. 2), а в другой (кроме этого показателя) — биомассу растений (рис. 3).

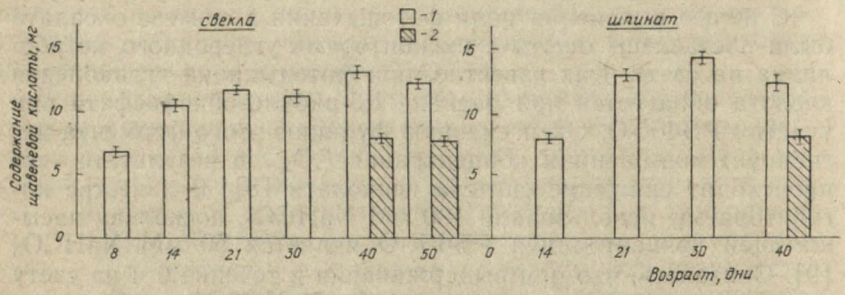


Рис. 2. Влияние формы азота на содержание щавелевой кислоты в листьях шпината и свеклы: *1* — NO_3^-; *2* — $NO_3^- \rightarrow NH_4^+$

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

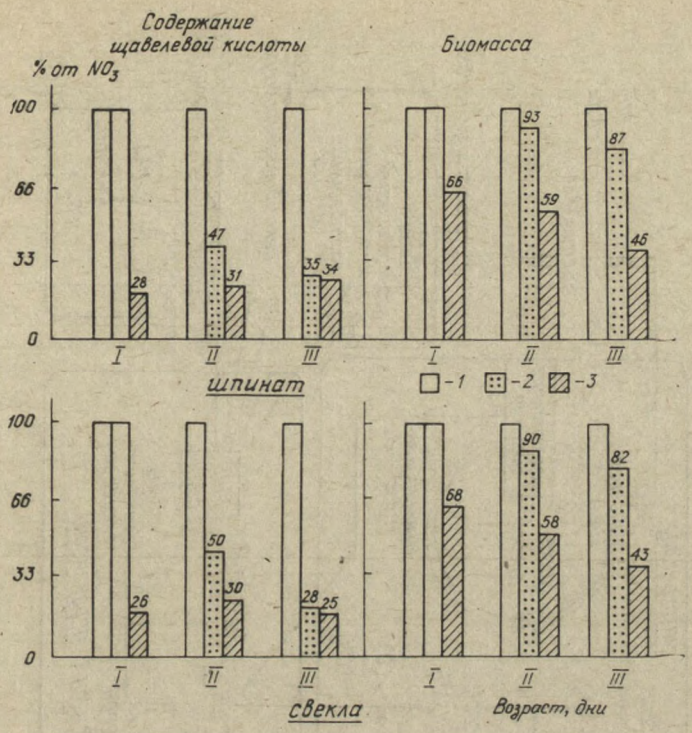


Рис. 3. Влияние формы азота на содержание щавелевой кислоты и биомассу в листьях шпината и свеклы: *1* — NO_3^-; *2* — $NO_3^- \rightarrow NH_4^+$; *4* — NH_4^+

Через 10 дней после переноса опытных растений на аммонийное питание содержание оксалата в листьях значительно снизилось (см. рис. 2). Из рис. 3, на котором полученные данные выражены в процентах от величин исследуемых показателей на нитратном питании, видно, что уже через 7 дней после перевода растений с нитратного на аммонийный источник азота, количество щавелевой кислоты снизилось у шпината на 53, а у свеклы — на 50%, тогда как биомасса их уменьшилась только на 3—10%. Через 18 дней содержание оксалатов снизилось до уровня, наблюдаемого при постоянном питании аммонийным азотом. При этом биомасса снизилась у шпината на 13%, а у свеклы — на 18%. Таким образом, восстановленная форма азота подавляет одновременно и

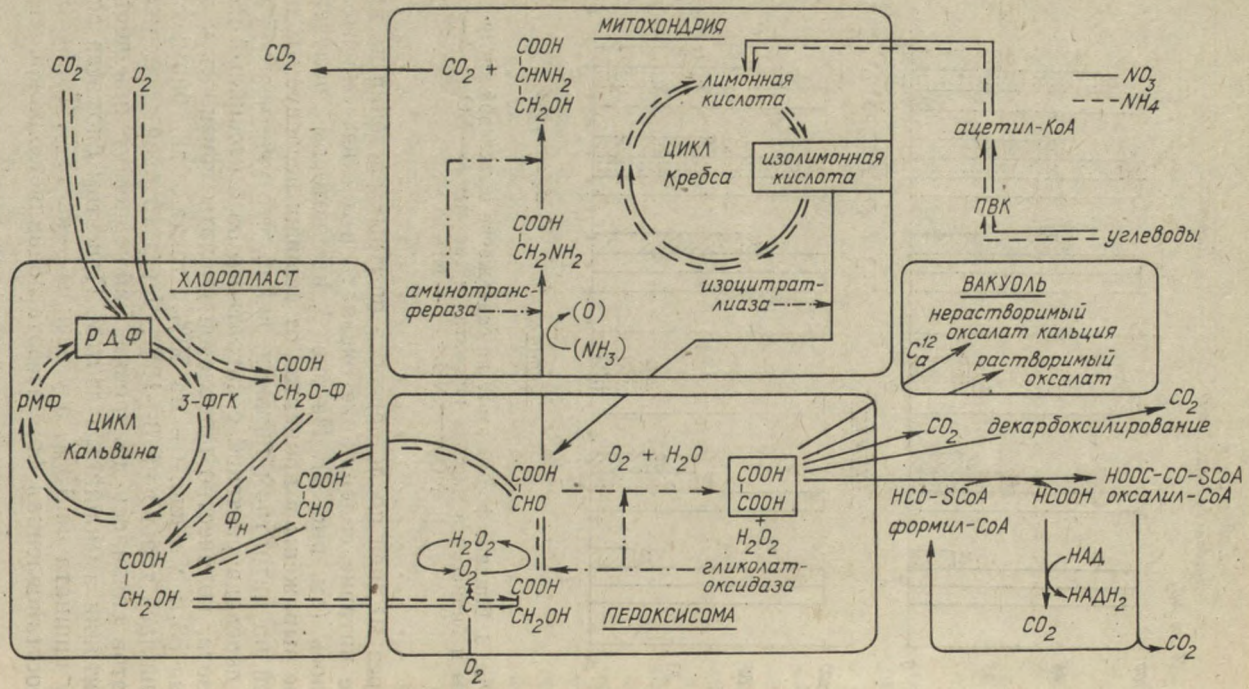


Рис. 4. Возможные пути метаболизма щавелевой кислоты в листьях C_3-растений

Digital Library (repository) of Tomsk State University http://vital.lib.tsu.ru

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

накопление щавелевой кислоты, и продуктивность растений. Поэтому такое питание целесообразно сочетать в растениеводстве с окисленной (нитратной) формой, достигая тем самым снижения уровня оксалатов при сохранении биомассы.

На основании анализов, полученных в работе, а также литературных данных составлена схема возможных путей метаболизма щавелевой кислоты в растениях в связи с формами азотного питания (рис. 4). Гликолевая кислота (предшественник оксалата) образуется в хлоропластах в процессе фотодыхания, непосредственно связанного с циклом Кальвина. Затем гликолат транспортируется в пероксисомы, в которых окисляется с помощью гликолатоксидазы в гликолевую кислоту. Последняя может возникать и из изолимонной кислоты — компонента цикла Кребса — через глиоксилатный шунт в результате функционирования изоцитратлиазы. Дальнейший путь превращения глиоксилата в значительной степени зависит от азотного питания. На нитратной форме азота глиоксилевая кислота превращается преимущественно в щавелевую кислоту, а на аммонийной — в аминокислоты (глицин и серин): образование аминокислот характерно в большей мере для молодых развивающихся листьев, тогда как щавелевой кислоты — для зрелых, закончивших формирование. Поэтому в молодых листьях оксалаты почти не накапливаются. Щавелевая кислота в виде нерастворимого оксалата концентрируется в вакуоле или подвергается дальнейшему окислению через формиат до углекислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чесноков В. А., Базырина Е. Н., Бушуева Т. М., Ильинская Н. М. Выращивание растений без почвы.— Л.: Изд-во Лен. ун-та, 1960. — 117 с.

2. Плешков Б. П. Практикум по биохимии растений. — М.: Колос, 1976, с. 182—185.

3. Солдатенков С. В., Мазурова Т. А. Анализ органических кислот растений методом ионного обмена и хроматографии на бумаге. — В кн.: Методы биохимического анализа растений. Л.: Изд-во Лен. ун-та, 1978, с. 192.

4. Hodgkinson A. Oxalic Acid in Biology and Medicine. — New-York: Academic Press, 1977. — 306 p.

5. Солдатенков С. В. Биохимия органических кислот растений. Л.: Изд-во Лен. ун-та, 1971. — 141 с.

6. Chang C. C., Beevers H. Biogenesis of Oxalate in plant tissues. — Plant Physiol., 1968, v. 43, N 10, p. 1821—1828.

7. Chang C. C., Huang A. C. Metabolism of Glycolate in Isolated Spinach Leaf Peroxisomes. — Plant Physiol,, 1981, v. 67, N 5, p. 1003—1006.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

8. Рубин Б. А., Гавриленко В. Ф. Биохимия и физиология фотосинтеза. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1977. — 328 с.

9. Романова А. К. Биохимические методы изучения автотрофии у микроорганизмов. — М.: Наука, 1980, 160 с.

10. Beevers H. Respiratory Metabolism in Plants. New-York: Row, Peterson and C°, 1961. — 247 p.

11. Кретович В. Л. Биохимия растений. — М.: Высш. шк., 1986. — 503 с.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ВЫДЕЛЕНИЕ CO_2 ИЗ ЛИСТЬЕВ ФАСОЛИ ЗА СЧЕТ ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЯ C_3- И C_4-КИСЛОТ, ОБРАЗУЮЩИХСЯ ПРИ ФОТОСИНТЕЗЕ

Т. Р. Пярник, О. Ф. Кээрберг, Х. И. Кээрберг

Институт экспериментальной биологии АН ЭССР

В настоящее время общепринято, что биохимической основой фотодыхания является декарбоксилирование продуктов метаболизма гликолевой кислоты, образующейся в реакции оксигенирования рибулозо-1,5-бисфосфата — РБФ. В то же время установлено, что выделение CO_2 из листа за счет декарбоксилирования ранних продуктов фотосинтеза наблюдается и в условиях, где оксигенирование РБФ подавлено, т. е. при высокой концентрации CO_2 и низкой концентрации O_2 [1, 2, 3]. Кроме того, при исследовании метаболизма экзогенных меченых субстратов показано, что образование CO_2 из пирувата и малата протекает одинаково как на свету, так и в темноте [4]. На основе этих данных было выдвинуто предположение, что кроме промежуточных продуктов гликолатного цикла субстратами дыхания на свету могут быть и C_3- и C_4-соединения, образующиеся в реакциях фотосинтетической ассимиляции CO_2 [5]. Для доказательства этого предположения в настоящей работе мы исследовали выделение CO_2 за счет декарбоксилирования C_3- и C_4-кислот, быстро метящихся при ассимиляции $^{14}CO_2$ листьями фасоли.

Материал и методика

В опытах использовали 14-дневные растения фасоли (Phaseolus vulgaris), выращенные под люминесцентными лампами. Из первых после семядолей листьев вырезали отрезки размерами 2,4×2,4 см^2, которые поместили в быстродействующую экспозиционную камеру для введения метки и измерения выделения $^{14}CO_2$ [6]. В камере одновременно экспонировали 3 отрезка из листьев разных растений. Каждый вариант состоял из 6 отрезков.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

После окончания экспозиции отрезки фиксировали в кипящем 80% этаноле. Экстрагирование и разделение продуктов фотосинтеза проводили по описанной ранее методике [7]. Для разделения аминокислот использовали автоматический анализатор аминокислот типа ААА-339 (фирма «Микротехна», ЧССР). Выделение $^{14}CO_2$ измеряли по разработанной нами методике [8].

Результаты и обсуждение

1. Выделение $^{14}CO_2$ при метаболизме C_3-соединений. С целью выяснения возможностей выделения CO_2 за счет декарбоксилирования C_3-соединений, образующихся при фотосинтезе из 3-фосфоглицериновой кислоты (ФГК), был проведен следующий опыт. Для достижения стационарного режима фотосинтеза отрезки из листьев освещались сперва в нерадиоактивной среде, затем выключили свет и листовую камеру переключили в систему, содержащую 0,1% $^{14}CO_2$ в азоте (<0,001% O_2). После 4-секундной темновой экспозиции в $^{14}CO_2$ листья в контрольном варианте фиксировали, а в опытных вариантах выдерживали в условиях,

Таблица 1

Распределение метки в продуктах 4-секундной темновой фиксации $^{14}CO_2$ листьями фасоли, % от общей радиоактивности материала

Соединения	Экспозиция в 0,1% $^{14}CO_2$ 4 с	Выдерживание в $^{12}CO_2$ 240 с			
	Темнота без O_2	Темнота без CO_2, 21% O_2	Темнота без CO_2 и без O_2	Темнота, 0,1% CO_2 без O_2	Свет, 0,1% CO_2, 21% O_2
ФГК + ФС	65,8	3,3	3,3	2,8	4,4
Аланин	1,1	57,3	58,6	47,7	6,5
C_4-кислоты	10,4	11,0	10,7	19,1	20,5
Сахароза — крахмал	1,6	1,9	1,8	1,6	54,5
Серин + глицин	0,2	0,8	0,8	1,3	2,8
Остальные соединения	6,0	1,2	1,1	2,5	4,3
CO_2	14,9*	24,5	23,7	25,0	7,0

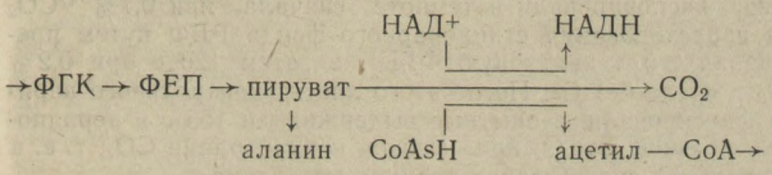
Примечание. До экспозиции листья освещались в среде с 0,03% $^{12}CO_2$ и 1% O_2 при интенсивности света 25 мВт·см$^{-2}$ и температуре 25 °С.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

приведенных в табл. 1 (CO_2 в первой графе означает количество $^{14}CO_2$, которое выделилось во время двухминутного фиксирования материала в кипящем этаноле (обозначен звездочкой), а в остальных графах — количество $^{14}CO_2$, выделенное из листьев во время выдерживания их после экспозиции).

После 4-секундной темновой фиксации $^{14}CO_2$ метка в основном обнаружилась в ФГК и в некоторых других фосфорилированных соединениях (ФГК+ФС, см. табл. 1). Заметное количество $^{14}CO_2$ (приблизительно 15% от поглощенной радиоактивности) выделилось во время фиксирования листьев за счет разложения нестабильных меченых соединений, таких как фосфоенолпируват (ФЕП), пируват и щавелево-уксусная кислота (ЩУК). Некоторая доля ^{14}C (10,4% от общей радиоактивности) включилась в продукты карбоксилирования ФЕП — в малат и аспартат.

Для исследования превращения ФГК через пируват листья после темновой фиксации $^{14}CO_2$ выдерживали в темноте в среде с 21% O_2, но без CO_2 (см. табл. 1). В течение 240 с радиоактивность фосфорилированных соединений значительно уменьшилась, что сопровождалось увеличением радиоактивности аланина и выделенного из листа CO_2. За это время метка из лабильных промежуточных фондов включилась в стабильные соединения, так как при фиксации листьев не наблюдали выделения $^{14}CO_2$. Переключение метки из ФГК и ФС в аланин и CO_2 показывает, что в темноте в среде без CO_2 ФГК превращается по пути



Карбоксилирование ФЕП в данных условиях опыта заблокировано из-за отсутствия в среде CO_2.

Распределение метки не зависит от присутствия кислорода, в чистом азоте оно совпадает с таковым при 21% O_2 (см. табл. 1). Для окислительного декарбоксилирования пирувата требуется НАД+, резервы которого после темновой фиксации CO_2, по-видимому, достаточны для поддержания процесса в течение наблюдаемого периода в среде без O_2. Добавление CO_2 во время выдерживания вызвало лишь небольшие сдвиги в распределении метки: радиоактивность C_4-кислот была на

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

9% больше, а аланина — на 11% меньше, чем в среде без CO_2.

Существенные сдвиги в распределении метки наблюдались при выдерживании листьев на свету. Более 50% радиоактивности зафиксировано в конечных продуктах фотосинтеза — в сахарозе и крахмале. На свету подавилось выделение $^{14}CO_2$ и включение метки в аланин, оно уменьшилось почти в 9 раз по сравнению с темновым вариантом. В то же время включение ^{14}C в C_4-кислоты протекало на свету и в темноте с одинаковой скоростью. Следовательно, на свету изменилось соотношение скоростей образования пирувата и C_4-кислот из ФЕП. Это может быть обусловлено подавлением активности пируваткиназы на свету. Для функционирования последней требуется присутствие АДФ [9], концентрация которого на насыщающем свету может оказаться недостаточной для активации этого фермента.

Изложенный опыт не позволяет судить о возможности выделения CO_2 при метаболизме C_4-кислот. После кратковременных экспозиций в $^{14}CO_2$ и последующего выдерживания листьев в среде $^{12}CO_2$ метка в молекулах C_4-кислот находится в положении, из которого она при декарбоксилировании не освобождается. Поэтому для исследования участия C_4-кислот в выделении CO_2 была применена несколько измененная схема опыта.

2. Выделение $^{14}CO_2$ при метаболизме C_4-кислот. Листья, находящиеся в стационарном состоянии фотосинтеза, экспонировали в темноте сначала при 0,7% $^{12}CO_2$ (для израсходования стационарного фонда РБФ путем превращения его в немеченую ФГК), а затем 120 с при 0,2% $^{14}CO_2$ в среде без O_2. После этого листья контрольного варианта фиксировали, а опытные выдерживали 155 с в нерадиоактивной среде без O_2 при высокой концентрации CO_2, т. е. в условиях, где оксигеназная реакция подавлена.

При такой постановке опыта метка в контрольном варианте обнаружилась в основном в C_4-кислотах в малате и аспартате (табл. 2). Значительная доля ^{14}C (27,6%) включалась в нестабильные соединения, которые разлагались во время фиксирования материала. Появление радиоактивности в фосфорилированных соединениях (ФГК+ФС) и в аланине показывает, что по меньшей мере 30% метки включилось в лист через карбоксилирование РБФ. Это значит, что в темноте продолжается медленная регенерация и карбоксилирование РБФ. В абсолютных единицах скорость этого процесса низка —

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Таблица 2

Распределение метки в продуктах 120-секундной темновой фиксации $^{14}CO_2$ после 4-секундного темнового поглощения 0,7% $^{12}CO_2$ листьями фасоли, % от общей радиоактивности материала

Соединения	Экспозиция в 0,7% $^{12}CO_2$ 4 с; 0,2% $^{14}CO_2$ 120 с	Выдерживание в $^{12}CO_2$ 155 с		
	Темнота, 1,0% O_2	Темнота, 0,2% CO_2 без O_2	Свет, 0,2% CO_2 без O_2	Свет, без CO_2, без O_2
C_4-кислоты	37,9	31,7	29,3	39,3
ФГК + ФС	12,2	2,2	1,1	8,9
Глицерат	1,3	0,5	1,9	6,0
Аланин	16,2	23,5	14,6	15,6
Сахароза + крахмал	1,5	1,6	11,0	14,2
Серин	1,1	1,6	1,7	10,4
Глицин	0,5	—	—	0,4
Остальные соединения	1,7	3,9	3,9	5,1
CO_2	27,6 *	35,0	36,9	—

Примечание. До экспозиции листья освещались в среде с 0,03% $^{12}CO_2$ и 1% O_2 при интенсивности света 25 мВт·см$^{-2}$ и температуре 25 °С.

0,7 нмоль·дм$^{-2}$·с$^{-1}$, что составляет около 0,5% от скорости стационарного фотосинтеза фасоли на насыщающем свету.

В течение 155-секундного выдерживания листьев в темноте выделилась приблизительно одна треть поглощенной радиоактивности (см. табл. 2). Основная доля выделенного $^{14}CO_2$ образовалась при метаболизме C_4-кислот и нестабильных соединений. Об участии C_3-кислот в процессе выделения $^{14}CO_2$ можно судить по включению метки в аланин, непосредственным предшественником которого является пируват. При выдерживании листьев в темноте радиоактивность аланина возрастала до 7,3%. По сравнению с первым опытом, где прирост радиоактивности аланина в аналогичных условиях был 46,6%, выделение $^{14}CO_2$ через пируват в данном опыте должно было быть в 6 раз меньше (около 4% от поглощенного $_{14}CO_2$). Можно предположить, что основная часть нестабильных соединений метаболизировалась через C_4-кислоты.

Пируват образуется и при декарбоксилировании C_4-кислот (малата). Однако в этой реакции его углеродный скелет остается немеченым, и при такой постановке опыта мы можем следить за превращением только той части пирувата, которая образуется непосредственно из ФЕП.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

При выдерживании листьев на свету образовалось примерно такое же количество $^{14}CO_2$, как и в темноте (табл. 2). При этом количество метки в аланине (по сравнению с контролем) не изменилось. Это показывает, что синтез пирувата из ФЕП на свету заблокирован, а весь $^{14}CO_2$ выделился из C_4-кислот. Выделение CO_2 из C_4-кислот на свету проявилось только в присутствии CO_2. В атмосфере без CO_2 и O_2 выделения $^{14}CO_2$ не наблюдалось (см. табл. 2). Прекращение выделения $^{14}CO_2$ не могло быть вызвано полной реассимиляцией CO_2 на свету, так как у C_3-растений это может случиться только при полностью закрытых устьицах, что в условиях нашего опыта маловероятно. По-видимому, причиной ингибирования образования CO_2 является недостаток НАДФ, требуемого для декарбоксилирования малата. Последняя реакция катализируется НАДФ-малик-энзимом, высокая активность которого найдена в хлоропластах и в цитоплазме [10].

По сравнению с первым опытом относительно мало меченого углерода на свету включилось в сахарозу и крахмал (прирост их радиоактивности составлял всего лишь 10—13%). Это показывает, что в данном опыте метка включилась в основном в соединения, которые не могут быть непосредственно использованы в цепи синтеза сахаридов. На свету в среде без CO_2 существенная доля радиоактивности накопилась в серине и глицерате. Повышалась также радиоактивность ФГК и ФС (по сравнению с вариантом с CO_2). При этом серин и глицерат не могли образоваться в реакциях гликолатного цикла, так как в отсутствии кислорода этот цикл не функционировал. На это указывают и очень низкие радиоактивности глицина во всех вариантах опыта. По-видимому, на свету в среде без CO_2 и O_2, где заблокирован метаболизм C_3-соединений через карбоксилирование ФЕП и превращение последнего в пируват, создаются условия для функционирования биосинтетического пути, обратного гликолатному: ФГК→глицериновая кислота→оксипировиноградная кислота→серин.

Проведенные нами опыты показывают, что C_3- и C_4-соединения, образующиеся в ранних реакциях фотосинтеза, могут быть источниками CO_2 в первые минуты после выключения света. На насыщающем свету ингибирован синтез пирувата из ФЕП. В присутствии CO_2 декарбоксилирование C_4-кислот протекает интенсивно как в темноте, так и на свету. Однако в среде без CO_2 на сильном свету выделение метки из C_4-кислот прекращается. Если предполагать, что на насыщающем свету синтез пирувата заблокирован недостатком АДФ, а де-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

карбоксилирование C_4-кислот в среде без CO_2 подавлено отсутствием НАДФ, то по мере уменьшения интенсивности света вплоть до самых низких ее значений должны постепенно увеличиваться соотношения АДФ/АТФ и НАДФ/НАДФ·H_2 и, следовательно, возрастать относительная скорость выделения CO_2 в условиях, где оксигеназная реакция подавлена. Подобная картина наблюдалась нами при изучении фотодыхания фасоли в зависимости от условий внешней среды [3].

ЛИТЕРАТУРА

1. Fock H., Klug K., Krampitz M.-J. Die spezifische Radioaktität der Glykolsäure und der photorespiratorischen CO_2-Entwicklung von Helianthus und Bohnenblättern nach $^{14}CO_2$-aufnahme bei verschiedenen CO_2-Konzentrationen. — Ber. Dtsch. Bot. Ges., 1978, B. 91, S. 539.

2. Bravdo B. A., Canvin D. Effect of carbon dioxide on photorespiration. — Plant Physiol., 1979, v. 63, p. 399.

3. Pärnik T. Photorespiratory decarboxylation at different CO_2 concentrations. — In: Kinetics of photosynthetic carbon metabolism in C_3-plants. Tallin, 1985, v. 1, p. 121.

4. Филиппова Л. А., Мамушина Н. С., Заленский О. В. О функционировании основных этапов темнового дыхания во время фотосинтеза. — Ботан. журн., 1982, т. 67, № 9, с. 1169.

5. Заленский О. В., Зубкова Е. К., Мамушина Н. С. и др. О метаболических связях между циклом Кальвина и циклом Кребса. — Физиология и биохимия культ. растений, 1985, т. 17, № 3, с. 253.

6. Юрисма Э. Я., Пярник Т. Р. Быстродействующая экспозиционная камера. Авт. свид. № 1049010 от 22 июня 1983 г., опубл. в Б. И. № 39 от 23 окт. 1983 г.

7. Вярк Э., Кээрберг Х., Кээрберг О. и др. Об экстрагируемости продуктов фотосинтеза растворами этанола. — Изв. АН Эстонской ССР. Биология, 1968, т. 17, № 4, с. 367.

8. Pärnik T., Keerberg A., Viil J. Estimation of photorespiration in bean and maize leaves. — Newsletter on the application of nuclear methods in biology and agriculture, 1976, N 6, p. 5.

9. Ireland R. J., De Luca V., Dennis D. T. Isoenzymes of pyruvate kinase in etioplasts and chloroplasts. — Plant Physiol., 1979, v. 63, N 5, p. 903.

10. Верхотурова Г. С., Астафурова Т. П. О направлении некоторых реакций цикла Кребса в зеленых листьях на свету. — Физиол. растений. 1983, т. 30, № 3, с. 580.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ФОТОСИНТЕЗ И ДЫХАНИЕ В ПРОДУКЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ ТРОПИЧЕСКИХ МАКРОВОДОРОСЛЕЙ ИЗ РОДА SARGASSUM

Э. А. Титлянов

Институт биологии моря ДВНЦ АН СССР

В настоящее время вполне определенно показано, что фотосинтетический процесс не тормозит катаболических реакций [1—4], а в некоторых случаях даже стимулирует их [5—6]. Работы настоящего сборника в большинстве своем подтверждают это положение и расширяют наши знания о механизмах функционирования и регуляции дыхательного метаболизма на свету. По нашему мнению, взаимодействие фотосинтеза и дыхания в фотосинтезирующей клетке можно рассматривать в плане идей о донорно-акцепторных отношениях между двумя процессами [7], один из которых является поставщиком субстрата (фотосинтез), другой — его аттрактантом (дыхание). При таком взаимодействии двух процессов активность фотосинтеза может определяться запросами дыхательного метаболизма на ассимиляты, что, в свою очередь, диктуется скоростью определенных синтетических процессов. В то же время при прямом взаимодействии этих двух процессов без включения в систему мощных буферных центров (накопление и расход высоковосстановленных, полимерных углеводов) интенсивность дыхания на свету должна определяться скоростью накопления ассимилятов в виде промежуточных продуктов дыхания (т. е. интенсивностью фотосинтеза).

Попытаемся с таких позиций рассмотреть экспериментальный материал по определению интенсивностей истинного фотосинтеза и темнового дыхания у тропических видов водорослей из рода Sargassum в течение светового дня в различных условиях освещения.

Материал и методы

Изучали водоросли из рода Sargassum, образующие заросли вдоль побережья Социалистической Республики Вьет-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

нам в заливе Бенгой и на острове Тху в Южно-Китайском море.

Для измерения величины ФАР в местах обитания водорослей использовался специально разработанный для этого полностью автономный подводный фотометр с германиевым фотодиодом, имеющим линейную световую характеристику. Измерительная часть фотометра выполнена на базе интегральной микросхемы КР544УД1 по схеме преобразователя ток — напряжение. Фотометр имеет пределы измерения количества солнечной радиации от 0,5 до 500 Вт·м$^{-2}$. Для регистрации только ФАР перед фотодиодом установлен светофильтр СЗС-24, имеющий полосу пропускания 300—740 мкм. Подводный фотометр прокалиброван в области ФАР по образцовому радиационному термоэлементу РТН 20 с.

Скорости видимого фотосинтеза и темнового дыхания определяли химическим методом Винклера [8—9]. Экспозиция водорослей как на свету, так и в темноте, составляла 1 ч. Разница температур воды в склянке до и после опыта никогда не превышала 1 °С. Опытные склянки помещались непосредственно в месте обитания объектов при температуре воды 24—26 °С. На основании данных о скоростях видимого фотосинтеза ($Ф_в$) и темнового дыхания ($Д_т$) рассчитывали скорость истинного фотосинтеза ($Ф_н$) по формуле $Ф_н = Ф_в + Д_т$.

Результаты

Изучение световых условий в зарослях саргассовых водорослей в заливе Бенгой и на острове Тху показало, что верхние (плавающие во время отлива и погруженные в прилив) части талломов в безоблачные дни получают ФАР от 110 до $90 \cdot 10^5$ Дж·м$^{-2}$·день$^{-1}$, средние затененные — от 10 до $7 \cdot 10^5$, а нижние предельно затененные — от 2 до $0{,}5 \cdot 10^5$ Дж·м$^{-2}$ × ×день$^{-1}$. В середине солнечного дня верхние части талломов освещены ФАР от 380 до 300 Вт·м$^{-2}$, средние — от 30 до 15 и нижние — от 5 до 1 Вт·м$^{-2}$. Освещенность внутри зарослей саргассумов зависит от глубины их произрастания (1—3 м), густоты зарослей (300—400 экз·м$^{-2}$), общей биомассы водорослей на единице площади дна (3—10 кг сыр. мас.·м$^{-2}$), а также от постепенного движения талломов под действием волн.

В среднем для всех исследованных зарослей саргассов в различные по освещенности дни количество ФАР, падающей на талломы, составляет для верхней поверхности зарослей от

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

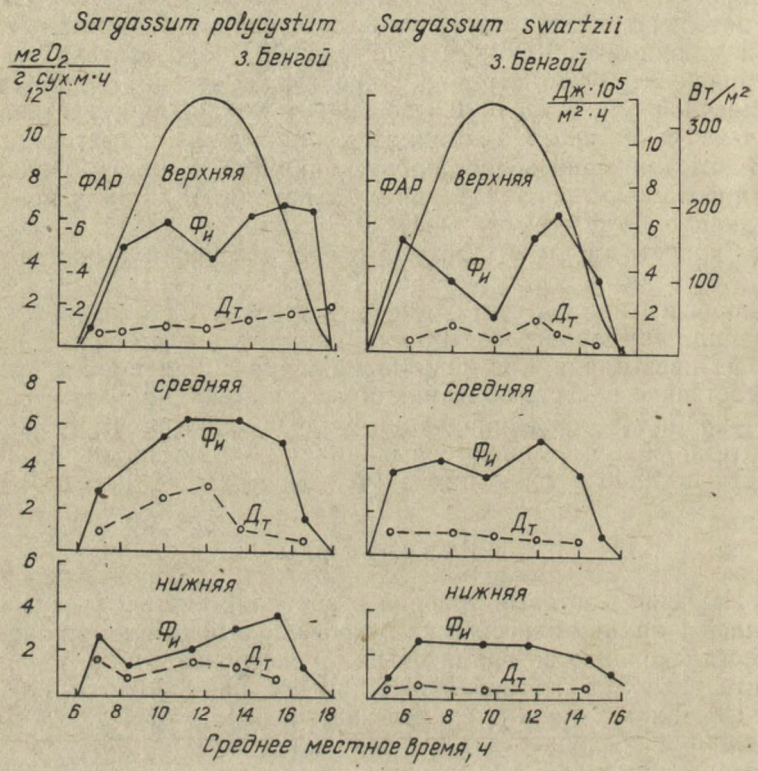
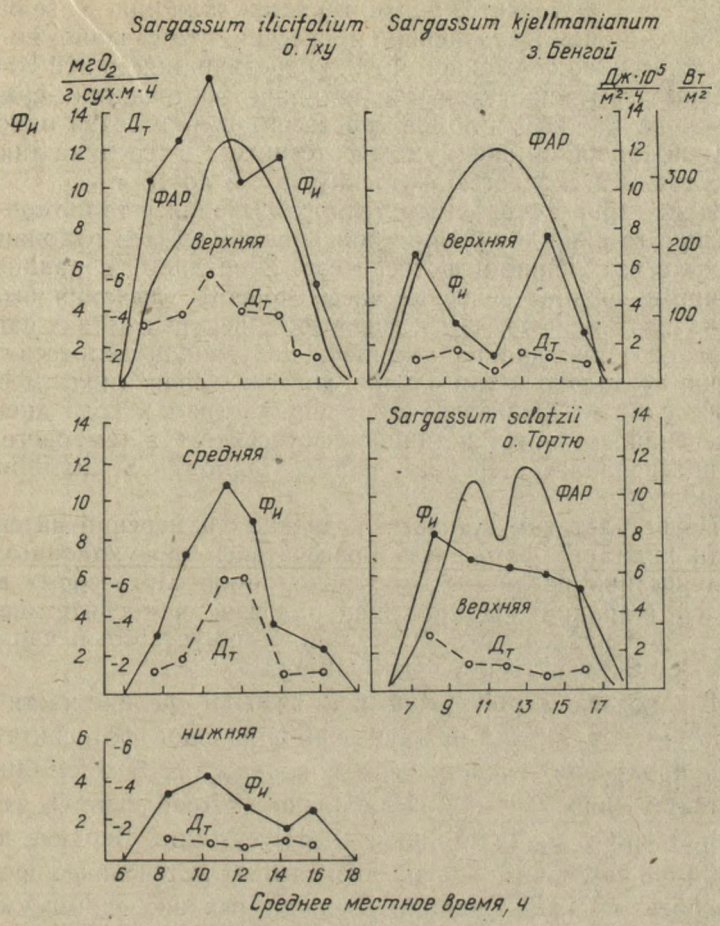


Рис. 1. Дневные изменения скоростей истинного фотосинтеза из Южно-Китайского моря, а также величины ФАР на глуби-

100 до 70, для средней — от 15 до 7, для нижней части зарослей — от 3 до 1 и для поверхности дна в зарослях — от 2 до 0,3% фотосинтетически активной радиации, падающей на воду ($ФАР_п$).

Дневные изменения скорости истинного фотосинтеза в верхних частях талломов S. polycystum, S. swartzii, S. ilicifolium и S. Kjellmanianum выражались двухвершинной кривой

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru



и темнового дыхания в разных частях талломов саргассумов не 0,3 м

с утренним и послеполуденным максимумами и полуденной депрессией фотосинтеза (рис. 1). Фотосинтез у S. swartzii и S. Kjellmanianum достигал максимальной скорости уже к 8 ч утра, а у S. polycystum и S. ilicifolium — к 10 ч. Полуденная депрессия фотосинтеза у всех видов саргассумов имела место при освещении выше 300 Вт·м$^{-2}$. Вечерний максимум фотосинтеза наблюдался после 14 ч при освещении около

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

200 Вт·м$^{-2}$. Фотосинтез верхних частей талломов S. sclotzii с о. Тортю не имел полуденной депрессии, что связано, по всей вероятности, со снижением ФАР в середине дня до 210 Вт·м$^{-2}$. Дневные изменения скорости истинного фотосинтеза средних и нижних частей талломов саргассов выражаются одновершинной кривой с максимумом фотосинтеза в середине дня или с постоянной скоростью фотосинтеза с 8 до 15 ч.

Изменения в скорости темнового дыхания у талломов саргассов в течение дня были в большинстве опытов однонаправленны с изменениями фотосинтеза. В среднем в ранние утренние и поздние вечерние часы скорость дыхания была в 1,5—2 раза меньше, чем в дневные. В верхних ветвях саргассов в середине дня наблюдалась полуденная депрессия дыхания, но только в том случае, когда таковая имела место и в фотосинтезе. Особенно четко параллелизм в ходе дневных изменений скоростей истинного фотосинтеза и темнового дыхания проявился в средних частях талломов S. ilicifolium и S. polycystum.

По результатам суточных и дневных измерений интенсивности видимого фотосинтеза рассчитаны продукционные характеристики различных частей талломов саргассовых водорослей (таблица). Наибольшая валовая фотосинтетическая продукция найдена у S. ilicifolium, S. polycystum и наименьшая — у S. swartzii и S. Kjellmanianum.

В зарослях S. polycystum и S. swartzii средние части талломов имеют 90%, а нижние — 40% валовой фотосинтетической продукции верхних частей, в зарослях S. ilicifolium — соответственно 50 и 20%. Наибольшее потребление O_2 за сутки найдено у S. ilicifolium и S. polycystum. Верхние части талломов за редким исключением дышат интенсивнее средних и особенно нижних частей. Дневное дыхание саргассумов в 1,5—2 раза интенсивнее ночного (в среднем за 12 ч дня и 12 ч ночи).

Наибольший средний уровень нетто-продукции имеют талломы S. ilicifolium. Несмотря на то, что валовая фотосинтетическая продукция S. polycystum значительно больше, чем S. swartzii, их нетто-продукция одинакова. Такое выравнивание происходит за счет различного соотношения скоростей фотосинтеза и дыхания у этих видов. У S. polycystum это соотношение колеблется от 2 до 4, а у S. swartzii — от 4 до 5.

Показатели продукционного процесса различных частей талломов саргассов

Вид, район работ	Часть таллома	$Ф_{макс}$	$Д_{дн}$	$Д_{нч}$	$П_{вал}$	$Д_{сут}$	$П_{нет}$	Ф/Д
		O_2, мг·г$^{-1}$ сух. массы·ч$^{-1}$			$O_м$, мг·г$^{-1}$ сух. массы·сут$^{-1}$			
S. polycystum, Залив Бенгой	Верхняя	6,8	1,2±0,4*	0,75±0,2	59,4	32,4	27,0	3,8
	Средняя	5,9	1,5±0,8	—	30,0	24,8	25,2	3,0
	Нижняя	3,5	0,9±0,4	—	23,0	18,9	4,1	2,1
S. swartzii, Залив Бенгой	Верхняя	6,4	1,1±0,3	0,95±0,8	45,0	16,0	29,0	5,5
	Средняя	5,3	0,9±0,2	—	43,5	21,8	21,7	4,4
	Нижняя	2,6	0,6±0,2	—	22,8	11,7	11,1	4,0
S. swartzii, Залив Бенгой	Верхняя	6,8	0,7±0,4	—	51,5	14,8	36,7	6,7
S. ilicifolium, о-в Тху	Верхняя	15,8	3,2±1,3	—	109,0	61,0	48,0	2,9
	Средняя	10,9	2,7±2,5	—	59,1	42,3	16,8	1,9
	Нижняя	4,2	0,8±0,3	—	27,9	16,0	11,9	2,8
S. Kjellmanianum, Залив Бенгой	Верхняя	7,3	1,2±0,4	0,62±0,3	43,8	26,0	17,8	3,1
	Верхняя	7,8	1,1±0,8	—	65,3	26,3	39,0	5,3

Примечание. $Ф_{макс}$ — максимальная скорость истинного фотосинтеза; $Д_{дн}$ и $Д_{нч}$ — средняя скорость темнового дыхания за день и ночь; $Д_{сут}$ — потребление O_2 на дыхание за сутки; $П_{вал}$ — валовая фотосинтетическая продукция за день; $П_{нет}$ ($П_{вал}$ — $Д_{сут}$) — нетто-продукция за сутки; Ф/Д — отношение средних скоростей истинного фотосинтеза и темнового дыхания в течение дня.

* Квадратичное отклонение от среднего значения при n=5.

Digital Library (repository) of Tomsk State University http://vital.lib.tsu.ru

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Обсуждение

Различные части талломов саргассумов из естественных зарослей очень неравномерно освещены, что и является причиной неодинаковых дневных изменений в скорости их истинного фотосинтеза.

Наиболее характерной чертой изменений скорости истинного фотосинтеза верхних ярко освещенных частей талломов является ее высокий уровень в утренние и вечерние часы и значительное ингибирование в полдень. Полуденная депрессия фотосинтеза верхних частей талломов наступает при освещении более 300 Вт·м^2 ФАР.

К сожалению, нам неизвестен механизм светоингибирования фотосинтеза, однако нами ранее было показано, что в полдень в верхних частях талломов саргассов снижаются потенциальные возможности фотосинтеза и падает содержание фотосинтетических пигментов. Средние части талломов саргассов получают только десятую долю ФАР от освещения верхних частей и имеют одновершинную кривую дневных изменений скорости фотосинтеза, однако максимальная за день величина их истинного фотосинтеза только на 20—30% меньше, чем в верхних частях талломов. Относительно высокие скорости фотосинтеза сильно затененных частей водорослей определяются комплексом адаптивных реакций, основными из которых являются накопление пигментов и повышение потенциальных возможностей фотосинтеза [10]. Нижние (предельно затененные) ветви саргассов полно и рационально используют падающий свет, однако уровень их максимального фотосинтеза составляет только 30—40% от такового верхних ветвей.

Благодаря отсутствию дневной депрессии фотосинтеза и предельно высокой адаптации к малым интенсивностям света средние части талломов саргассов не уступают верхним в валовой и нетто-продукции.

При параллельном анализе интенсивностей истинного фотосинтеза и темнового дыхания саргассов установлена их взаимосвязь. Прежде всего наиболее продуктивный вид S. ilicifolium имеет наивысший уровень дыхания как в течение дня, так и суммарный за сутки, а наименее продуктивный S. swartzii — самый низкий уровень дыхания. Дыхательная активность различно освещенных частей талломов положительно коррелирует в течение всего дня со скоростью их истинного фотосинтеза. Ночью саргассы дышат в 1,5—2 раза ме-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

нее интенсивно, чем днем. Однонаправленность в изменении фотосинтеза и дыхания, однако не приводит к постоянству их соотношения. Так, у наиболее продуктивного вида S. ilicifolium величина отношения средних скоростей истинного фотосинтеза и темнового дыхания в общем по таллому составляет 2,5, а у наименее продуктивных видов — около 5. Прямая зависимость активности анализируемых процессов, на наш взгляд, может быть вызвана двумя причинами. Во-первых, можно представить, что дыхательный процесс в условиях активного роста тканей является мощным аттрагирующим центром для промежуточных и первых конечных продуктов фотосинтеза. Ростовые процессы через дыхательный метаболизм активируют работу фотосинтетического аппарата водорослей, значительно повышая уровень их фотосинтетической продуктивности. Во-вторых, в случае прямого использования промежуточных или «молодых» продуктов фотосинтеза в дыхательном метаболизме активность последнего будет прямо зависеть от скорости синтеза ассимилятов. Однонаправленность в изменении интенсивностей процессов возможна только в тех случаях, когда между донором и акцептором продуктов нет буферных систем (накопление и расход полисахаридов), а также когда скорости двух взаимодействующих процессов близки между собой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chapman E. A., Graham D. The effect of light on the tricarboxylic acid cycle in green leaves. I. Relative rates of the cycle in the dark and the light. — Plant Physiol., 1974, v. 53, N 6, p. 879.

2. Шумилова А. А. Федосеенко А. А., Степанова А. М. Влияние света на функционирование цикла Кребса в листьях кукурузы. — Научные доклады высшей школы. Биологические науки, 1976, № 9, с. 87.

3. Заленский О. В., Зубкова Е. К., Мамушина Н. С., Филиппова Л. А. К вопросу о взаимоотношениях фотосинтеза и дыхания в ассимилирующей клетке. Исследование гликолиза и цикла Кребса на свету и в темноте в клетках хлореллы. — Ботанический журнал, 1980, т. 65, № 9, с. 1141.

4. Singh P., Naik M. S. Effect of photosynthesis on dark mitochondrial respiration in green cells. — FEBS Letters, 1984, v. 165, N 2, p. 145.

5. Верхотурова Г. С., Астафурова Т. П. Регуляция светом некоторых реакций ЦТК в листьях фасоли. — В кн.: Цикл трикарбоновых кислот и механизмы его регуляции. IV объединенный симпозиум биохимических обществ СССР и ГДР. М.: Наука, 1977, с. 29.

6. Верхотурова Г. С., Астафурова Т. П. О направлении некоторых реакций цикла Кребса в зеленых листьях на свету. — Физиология растений, 1983, т. 30, вып. 3, с. 580.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

7. Мокроносов А. Т. Фотосинтетическая функция и целостность растительного организма. — 42-е Тимирязевские чтения. М.: Наука, 1983, 63 с.

8. Drew E. A., Robertson W. A. A simple lield version of the Winkler determination of dissolved oxygen. — New Phytol., 1974, v. 73, p. 793.

9. Сиренко А. А., Сакевич А. И., Осипов Л. Ф. и др. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. — Киев: Наукова думка, 1975. — 247 с.

10. Титлянов Э. А., Колмаков П. В., Лелеткин В. А. Новый тип адаптации морских макрофитов к интенсивности света (Ulva — тип).— Биология моря, 1987 (в печати).

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ЭНЕРГЕТИЧЕСКАЯ МОЩНОСТЬ ФОТОДЫХАНИЯ ХЛОРЕЛЛЫ В СВЯЗИ С УСЛОВИЯМИ УГЛЕКИСЛОТНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ

В. Е. Петров, Г. С. Клементьева, Зу Гван Чхол, С. В. Зубова, Н. Л. Лосева

Институт биологии КФ АН СССР

В 1968 г. Л. Н. Беллом и др. [1] было показано, что в синей области спектра (432 нм) около половины энергии света запасается хлореллой в результате процессов, не связанных с выделением кислорода, в то время как в красной области спектра сопряжение газообмена и энергообмена было полным. Однако, как показали дальнейшие исследования, эффект превышения четкой спектральной зависимости не имеет, поскольку при насыщающих интенсивностях света превышение энерго- над газообменом наблюдается не только на синем, но и на красном свету. В среднем это превышение составляет около 40%, хотя в целом ряде случаев были получены и более высокие значения [2]. Сравнение абсолютных значений скоростей также указало «на превышение скорости запасания энергии над скоростью, рассчитанной по поглощению кислорода как на синем, так и на красном свету» [2, с. 479]. Причина того, почему с увеличением интенсивности красного света достигается эффект, присущий синему свету, остается неясной.

Расхождение между энерго- и газообменом при фотосинтезе хлореллы имеет место и в норме, когда используется естественный (белый) свет, а не его узкая спектральная область [4, 5]. Показано, в частности, что при освещении белым светом порядка 40% световой энергии запасается хлореллой без соответствующего выделения кислорода (видимого фотосинтеза).

Если эффект расхождения между энерго- и газообменом экспериментально хорошо доказан и сомнений не вызывает, то механизм этого эффекта, конкретная природа процессов, обусловливающих превышение количества запасаемой световой энергии хлореллой над рассчитываемым по скорости фотосинтетического выделения кислорода, остаются недостаточно понятными.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Превышение энергообмена над газообменом можно объяснить наличием бескислородных процессов типа циклического и псевдоциклического фотофосфорилирования, в ходе которых энергия запасается без видимого выделения кислорода [1, 4, 5]. Возможно и иное объяснение: свет стимулирует усиление фотоокислительных процессов и прежде всего продуктов гликолатного метаболизма, связанных с поглощением кислорода, однако энергия окисления деградирует в тепло не полностью, а частично сохраняется в растении. В таком случае энергетическая роль фотодыхания могла быть близкой к той, которую выполняет обычный дыхательный метаболизм в темноте [6], когда около половины энергии окисления дыхательного субстрата сохраняется в форме АТФ и используется в дальнейшем на выполнение общеклеточной «работы».

Причастность фотоокислительных процессов в проявлении эффекта несоответствия базируется в основном на данных, полученных в условиях, благоприятных для фотодыхания, в частности, в случае дефицита CO_2 [6—7], хотя сам эффект (завышенное по сравнению с газообменом запасание световой энергии) был обнаружен в оптимальных по углекислоте условиях. Проведенная сравнительная оценка непосредственно определяемой и расчетной скорости запасания энергии позволила установить, что в оптимальных для фотосинтеза условиях (насыщающая или близкая к насыщающей концентрации CO_2 в среде) значимость фотометаболизма гликолата в энергетическом балансе ассимилирующей клетки невелика и фотодыхание не играет существенной роли в определении величины эффекта несоответствия между энерго- и газообменом [8].

Цель настоящей работы — исследование энергетической роли фотометаболизма гликолата в энергетическом балансе ассимилирующей клетки и эффекте несоответствия между энерго- и газообменом при фотосинтезе хлореллы в условиях углекислотного дефицита. Одной из побудительных причин проведения работы явилось то обстоятельство, что полученные ранее результаты [7] не позволяют оценить скорость фотометаболизма гликолата в сопоставимых с интенсивностью фотосинтеза величинах и тем самым его возможную значимость в энергетическом балансе клетки.

Методика

Объектом исследования служила одноклеточная водоросль Chlorella pyrenoidosa-82 (в современной классификации Chl.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

vulgaris, Beiyer) [9]. Хлореллу выращивали на среде Тамийя в накопительном режиме при температуре 30°, барботировании воздухом, содержащим 1,5 об.% CO_2, и освещении люминесцентными лампами белого света интенсивностью 10 клк. Скорость запасания световой энергии определяли с помощью дифференциального фотомикрокалориметра, выполненного на базе ДАК-1-1А [10], интенсивность фотосинтеза (выделения кислорода) определяли амперометрически с использованием закрытого электрода Кларка [11] и выражали в единицах энергии умножением на коэффициент 112 ккал/моль O_2.

Для ингибирования метаболизма углерода по гликолатному пути использовали гидразид изоникотиновой кислоты (ГИНК, $1 \cdot 10^{-3}$ М) [12]. После ресуспендирования в буфере Варбурга-9 (буфере Варбурга-8, фосфатном буфере) к суспензии клеток хлореллы добавляли гликолат (ГИНК+гликолат) и через 20—25 мин экспозиции в темноте проводили соответствующие измерения при интенсивности света порядка $7—8 \cdot 10^4$ эрг/см^2·с. Количество выделяемого клетками хлореллы гликолата учитывали колориметрическим методом [13]

Результаты и обсуждение

Введение в суспензию клеток хлореллы ГИНК, который ингибирует метаболизм углерода по гликолатному пути на этапе превращения глицина в серин [12], а также гликолевой кислоты отдельно или совместно с ГИНК, не оказало заметного влияния как на расчетную, так и на непосредственно определяемую скорость запасания энергии, а следовательно, и на соотношение этих показателей (рис. 1). Такой результат совместим с предположением о весьма низкой скорости фотодыхания у хлореллы при насыщающих или близких к насыщающим концентрациям CO_2 в среде и подтверждает ранее полученные нами данные [8].

При снижении уровня углекислотного обеспечения клеток хлореллы введение в суспензию гликолата (и тем самым «включение» гликолатного пути фотодыхания) несколько снижает скорость видимого фотосинтеза, одновременно возрастает скорость запасания энергии. По направленности изменений энергетических показателей такой результат и следовало ожидать в предположении, что часть энергии окисления гликолата сохраняется. Однако абсолютные величины инициируемых экзогенным гликолатом изменений учитываемых показателей невелики (5—15%) и находятся в пределах ошибки опыта.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

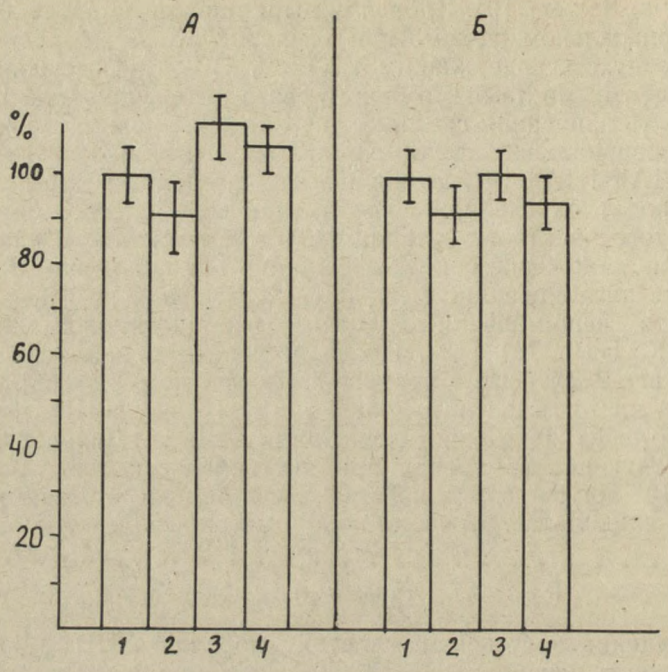


Рис. 1. Влияние гликолата и гидразида изоникотиновой кислоты на процесс запасания энергии клетками хлореллы: *1* — контроль, буфер Варбурга-9; *2* — Гинк, $1 \cdot 10^{-3}$ М; *3* — гликолат. $5 \cdot 10^{-3}$ М; *4* — ГИНК+гликолат; *А* — прямые; *Б* — расчетные показатели. Исходные данные: скорость запасания энергии — 0,61 кал/мг сухой массы водорослей в час; интенсивность фотосинтеза — 0,50 кал/мг сухой массы водорослей в час

Если же учесть, что расхождение между непосредственно определяемой и рассчитываемой скоростью запасания энергии может достигать 40—60%, то объяснить этот эффект лишь сохранением части энергии окисления продуктов фотометаболизма гликолата не представляется возможным.

Торможение фотодыхания введением ГИНК также не оказало влияния на скорость фотосинтеза и запасания энергии, а следовательно, и на эффект несоответствия между энерго- и газообменом (рис. 2). Этого и следовало ожидать, так как известно [12], что ГИНК в широком диапазоне концентраций CO_2 не влияет на скорость видимого фотосинтеза хлорел-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

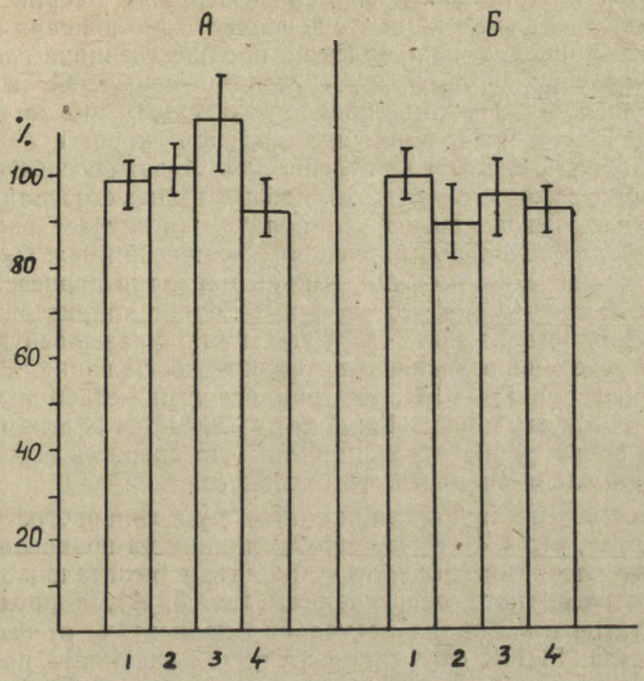


Рис. 2. Влияние гликолата и ГИНК на величину расхождения между энерго- и газообменом при фотосинтезе хлореллы: *1* — контроль, фосфатный буфер; *2* — ГИНК, $1 \cdot 10^{-3}$ М; *3* — гликолат, $5 \cdot 10^{-3}$ М; *4* — ГИНК+гликолат; *А* — прямые; *Б* — расчетные показатели. Исходные данные: скорость запасания энергии — 0,411 кал/мг сухих водорослей в час; интенсивность фотосинтеза — 0,320 кал/мг сухих водорослей в час

лы и в этом отношении полученные нами результаты не несут элемента новизны. Новым является тот факт, что ГИНК не оказал влияния и на скорость запасания энергии при снижении концентрации CO_2 в среде. Таким образом, независимо от условий углекислотного обеспечения ни торможение фотодыхания (введением ГИНК), ни его стимуляция (введением экзогенного гликолата) существенного влияния на величину эффекта несоответствия не оказали.

Следует отметить, что гидразид изоникотиновой кислоты вряд ли можно рассматривать как истинный ингибитор фотодыхания, используя в качестве тест-процесса поглощение кис-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

лорода. ГИНК тормозит превращение глицина в серин (реакцию, достаточно удаленную от первичного поглощения кислорода), что приводит к накоплению предшественника глицина, т. е. гликолевой кислоты, и выведению последней в среду культивирования. Поэтому предположительно можно допустить, что ГИНК, не изменяя изначальной скорости поглощения кислорода (видимого фотосинтеза), будет способствовать увеличению выхода гликолата и возрастанию его концентрации в среде. Тогда выход гликолата (в случае введения ГИНК) более точно по сравнению с изменениями в O_2 обмене, за который отвечают, по крайней мере, три процесса (фотосинтез, темновое и фотодыхание), будет характеризовать мощность одного из них — фотодыхания. Указанный подход имеет определенное экспериментальное обоснование. Так, по мнению авторов [14—16], внутриклеточный метаболизм гликолата весьма ограничен. Гликолат выделяется клетками хлореллы в среду суспендирования, так что скорость выделения пропорциональна скорости его биосинтеза.

Многократные определения содержания гликолевой кислоты показали, что ГИНК не оказал влияния на количество выделяемого клетками хлореллы гликолата в оптимальных условиях углекислотного обеспечения (рис. 3, *А*), а продукция гликолата не превышала нескольких процентов от скорости фотосинтеза. ГИНК стимулировал выход гликолата при снижении содержания углекислоты в среде (рис. 3, *Б*), что указывает на возможность его внутриклеточного метоболизма, хотя и ограниченную, так как количество экскретируемого хлореллой в этих условиях гликолата возросло лишь на 15—20%. Увеличилась также абсолютная скорость выделения (образования) гликолевой кислоты клетками хлореллы, однако и в этом случае скорость фотодыхания по гликолатному пути была на порядок меньше интенсивности фотосинтеза. Эти данные хорошо согласуются с ранее рассмотренными определениями фотосинтеза и подтверждают общее заключение о недостаточной емкости фотодыхания для того, чтобы быть ответственным за экспериментально получаемые значения эффекта несоответствия (40—50%). Следует отметить, что результаты, количественно близкие к нашим, были получены и другими авторами. Так, максимальное отношение между продукцией гликолата и поглощением CO_2 в отсутствие ГИНК было равным 1 : 20, при введении ГИНК оно могло возрастать до 1 : 6 и составлять, таким образом, 15—17% [12]. По данным [17] при насыщающих интенсивностях синего и красного

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

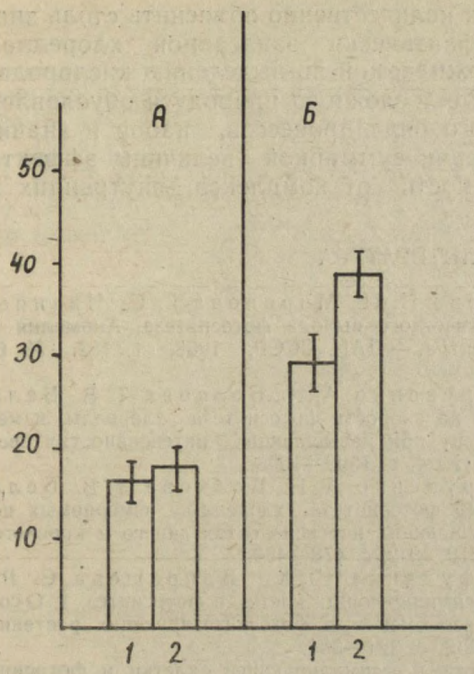


Рис. 3. Выделение гликолевой кислоты клетками хлореллы в зависимости от условий углекислотного обеспечения: *1* — контроль; *2* — ГИНК, 1×10^{-3} М; А — буфер Варбурга-9; *Б* — буфер Варбурга-8; по оси ординат — выход гликолата, мкг/мг сухих водорослей

света, когда избыточное запасание энергии наблюдалось в обоих спектральных областях [2—3], в среду выделялось 8—12% углерода, ассимилированного хлореллой в условиях естественной концентрации углекислоты (0,03%). При ненасыщающих интенсивностях света, позволяющих наблюдать повышенное запасание энергии исключительно при освещении коротковолновым светом [2—3], введение ингибитора оксидазы гликолевой кислоты α-гидроксипиридинметансульфоната способствовало усилению выхода гликолата на синем свету с 2,7 до 12% от общей фиксации CO_2. Однако авторы [17] придерживаются иного мнения, полагая, что: «В условиях, когда образуется гликолевая кислота и по тем или иным причинам нет ее выделения в среду, дальнейшее ее окисление может быть сопряжено с сохранением части энергии. Это и привело бы к расхождению между энерго- и газообменом» (с. 1094).

В заключение следует отметить, что в ходе исследования природы открытого Л. Н. Беллом и др. (1968) эффекта несоответствия между энерго- и газообменом рассматривались различные механизмы, обусловливающие его, но ни один из

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

них не давал возможности количественно объяснить столь значительное превышение фактически запасаемой хлореллой энергии по сравнению с ожидаемой по выделению кислорода. Возможно, что эффект имеет сложную природу и обусловлен функционированием целого ряда процессов, набор и значимость которых в проявлении суммарной величины эффекта могут меняться в зависимости от комплекса внутренних и внешних факторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белл Л. Н., Шувалова Н. П., Миронова Г. С., Ничипорович А. А. Спектр энергетического выхода фотосинтеза. Аномалия в коротковолновой области спектра. — ДАН СССР, 1968, т. 182, № 6, с. 1439—1442.

2. Шувалова Н. П., Крупенко А. Н., Волкова Т. В., Белл Л. Н. Влияние качества света на скорость фотосинтеза хлореллы, измеряемого по энерго- и газообмену при насыщающих интенсивностях света. — ДАН СССР, 1973, т. 207, № 4, с. 1006—1008.

3. Шувалова Н. П., Крупенко А. Н., Волкова Т. В., Белл Л. Н. О соотношении скоростей фотосинтеза хлореллы, измеряемых по энерго- и газообмену при насыщающих интенсивностях синего и красного света. — ДАН СССР, 1973, т. 210, № 2, с. 478—480.

4. Петров В. Е., Сейфуллина Н. Х., Байрашева С. Р., Лосева Н. Л. Энергетика ассимилирующих клеток и фотосинтез. 1. О соотношении между энерго- и газообменом в фотосинтезирующих растениях. — Бот. журн. 1974, т. 59, № 3, с. 321—331.

5. Петров В. Е. Энергетика ассимилирующей клетки и фотосинтез. — Казань: Изд-во Каз. ун-та, 1975. — 158 с.

6. Крупенко А. Н., Волкова Т. В., Шувалова Н. П., Белл Л. Н. Влияние диурона на соотношение между энерго- и газообменом при фотосинтезе на синем свету. — ДАН СССР, 1976, т. 228, № 4, с. 1001—1004.

7. Керимов С. Х., Демидов Э. Д., Маслов А. И., Белл Л. Н. Превращение гликолата и глицина в клетках хлореллы. — Физиол. раст., 1980, т. 27, вып. 1, с. 52—58.

8. Лосева Н. Л., Клементьева Г. С., Трибунских В. И., Петров В. Е. К энергетике фотометаболизма гликолата клетками хлореллы. — Физиол. раст., 1986, т. 33, вып. 4, с. 654—660.

9. Андреева В. М. Род Chlorella. — Л.: Наука, 1975. — 80 с.

10. Лоскутников А. И., Петров В. Е., Лосева Н. Л., Сейфуллина Н. Х. К методике изучения энергетики фотобиологических процессов. Деп. в ВИНИТИ, № 3432—80 ДЕП., 1980.— 16 с.

11. Гришина Г. С., Белл Л. Н., Букина Г. С. Применение амперометрического метода для исследования обмена кислорода на свету. — Физиол. раст., 1966, т. 13, № 4, с. 737—741.

12. Pritchard G. G., Griffin W. J., Whittingham C. P. The effect of carbon dioxide concentration, Light intensity and Isonicotinyl Hydrazide on the Photosynthetic Production of Glycolic Acid by chlorella.— J. Exp. Bot., v. 13, N 38, p.p. 176—185, 1962.

13. Calkins V. P. Microdetermination of glycollic and oxalic acids.— Ind. and Eng. Chem. Anal. Eds. 1943, 15, p. 762.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

14. Hess Y. L., Tolbert N. E. Glycolate pathway in algae. — Plant. Physiol., 1967, v. 42, N 3, p. 371.

15. Максимова И. В., Камаева С. С. Влияние концентрации кислорода и интенсивности света на фотосинтез и выделение органических веществ клетками Chl. pyrenoidosa штамм 82. — Научн. докл. Высш. школы. Биол. науки, 1978, № 3, с. 113.

16. Chollet R., Ogren W. L. Regulation of photorespiration in C_3 and C_4 species. — Bot. Rev., 1975, v. 41, N 2, p. 138.

17. Демидов Э. Д., Керимов С. Х., Белл Л. Н. О связи между выделением гликолевой кислоты и энергетической обеспеченностью клеток хлореллы на свету. — Физиол. раст., 1978, т. 25, вып. 5, с. 1089.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

НОВЫЙ ПОДХОД К ОПТИМИЗАЦИИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА АССИМИЛИРУЮЩЕЙ КЛЕТКИ В СВЯЗИ С ДЕЙСТВИЕМ ВЫСОКИХ ТЕМПЕРАТУР

Н. Л. Лосева, С. И. Панкратова, Р. И. Эстрина, В. М. Дьяков, В. Е. Петров

Институт биологии КФ АН СССР

Результирующим выражением энергетического статуса ассимилирующей клетки является ее энергетический баланс, определяемый работой двух основных энергетических процессов — фотосинтеза и дыхания. От того, насколько близки к оптимальным соотношения энергопотребляющих и энерговырабатывающих процессов, насколько благоприятно складывается внутриклеточный энергетический баланс, во многом и будет определяться способность зеленой клетки реализовать обусловленные генотипом потенциальные возможности.

В настоящей работе рассматривается применение калориметрического метода в сочетании с рядом известных физиологических методов с целью изучения энергетических взаимоотношений, отражающих интегральные связи между процессами на уровне целостного организма, органа, ассимилирующей клетки, возможностей оптимизации энергетического обмена растительной клетки с применением физиологически активных соединений.

Выбор калориметрического метода как основного объясняется тем, что он является наиболее интегральным, отражающим функциональное состояние избранной системы — клетки, органа и т. д. Это объясняется тем, что каждое явление жизни, каждая реакция обмена веществ клетки в ее взаимосвязи с внешним миром связаны либо с поглощением, либо с выделением энергии, а в конечном счете тепла. В таком случае термограмма растительного организма (графическое изображение скорости теплопродукции клеток живого организма) может рассматриваться как конечное выражение «внутриклеточной работы» и, следовательно, количественно характеризовать его функциональное состояние. С учетом сказанного становится понятным общее заключение о том, что термограмма является прекрасным численным выражением суммарной функциональной активности живой системы [1].

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Методика

Объектом изучения служили проростки яровой пшеницы Московская 35, выращенные в кюветах на водной среде при температуре 25 °С, освещенности около 10 клк люминесцентными лампами дневного света. Исследования проводили на 8—14-дневных проростках пшеницы. Кинетику тепловыделения (Q) учитывали непосредственно с помощью дифференциального микрокалориметра ДАК-1—1А по ранее описанной методике [2]. Следует, однако, отметить, что тепловыделение (Q) как самостоятельный показатель до настоящего времени не использовался в характеристике физиологического состояния растений.

Как правило, величина Q определялась лишь для установления энергетического баланса растительного объекта, т. е. соотношения между количеством энергии, освобождаемой в процессе дыхания (Е), и количеством выделяемой теплоты [3]. В то же время кинетические определения теплоотдачи растением позволяют получить значительно более емкую информацию об энергетическом состоянии организма, судить о направленности изменений функциональной активности растения. Интенсивность фотосинтеза учитывали манометрически [4]. В качестве метки для определения биосинтеза липидов использовали 1-^{14}С ацетат, их содержание и набор учитывали по [5]. Радиоактивность суммарных липидов определяли в 100 мкл суммарного липидного экстракта на автоматическом жидкостном сцинтилляционном счетчике Delta-300. В работе использовали довольно специфический ингибитор фотосинтеза — диурон (ДХММ). В предварительных опытах была определена концентрационная зависимость степени ингибирования видимого фотосинтеза (по выделению O_2) и отобрана концентрация ингибитора ($1 \cdot 10^{-5}$М), подавляющая фотосинтез на 35—50%. Для оптимизации энергетического обмена растений при тепловом стрессе использовали мивал [2]. С целью выявления дозовой кривой и установления влияния концентрации препарата на наиболее чувствительную функцию зеленого растения (рост) регулятор роста мивал использовали в широком диапазоне концентраций (от 0,15 до 0,01%). В дальнейших исследованиях в основном использовали концентрацию силатрана 0,025%, лишь незначительно подавляющую рост на начальных этапах развития проростков пшеницы.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Результаты и обсуждение

Как отмечалось ранее, результирующим выражением жизнедеятельности растительного организма является его термограмма. Величина начальной скорости тепловыделения определяется исходным функциональным состоянием организма и поддерживается на относительно постоянном уровне в течение длительного времени при оптимальных условиях жизнеобеспечения растения (температура, водоснабжение, аэрация и пр.) [2], но резко меняется при действии неблагоприятных факто-

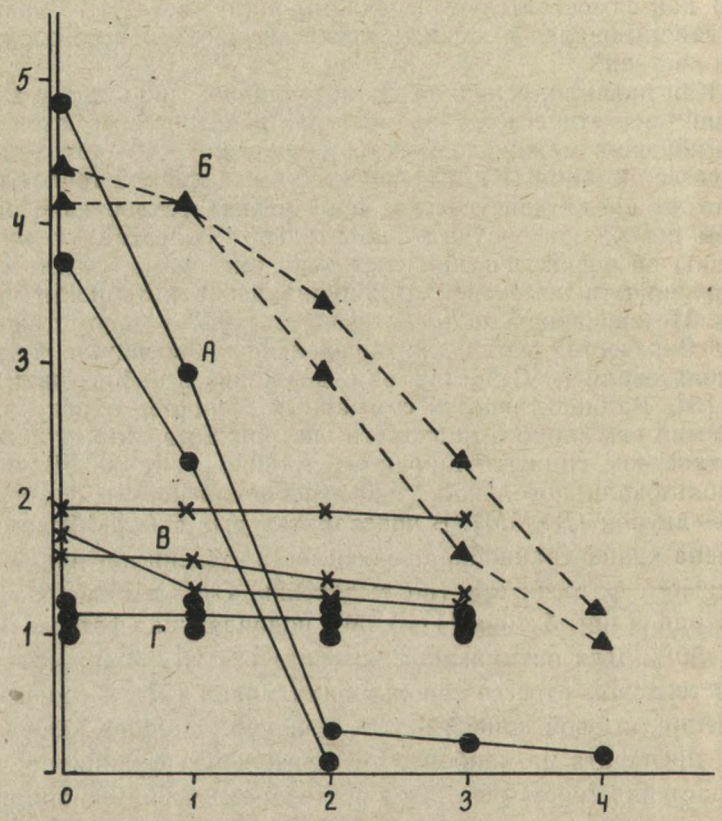


Рис. 1. Семейство термограмм проростков пшеницы при различных температурах: по оси абсцисс — время, ч; по оси ординат — скорость теплопродукции, кал/г сырой массы/ч; *А* — 45 °С; *Б* — 43 °С; *В* — 40 °С; *Г* — 25 °С

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ров среды. Как видно из рис. 1, вначале происходит существенное возрастание скорости тепловыделения, которое через некоторое время сменяется снижением величины Q до значительно более низкого по сравнению с контролем уровня. Подобная двухфазность, по-видимому, является неспецифической реакцией растения на действие многих неблагоприятных внешних факторов [2].

Время излома на термограмме и крутизна излома служат определенной характеристикой функционального состояния ассимилирующей клетки (рис. 1). Как было показано нами ранее [2], можно считать закономерностью, что чем ближе данная температура к оптимальной, тем позже наступает и менее выражен излом на термограмме. Высказанное предположение можно экспериментально проверить, направленно изменяя уровень энергетического обмена растения. Из рис. 2, *А* видно, что скорость тепловыделения проростков, фотосинтез которых был примерно наполовину ингибирован диуроном, значительно ниже, чем контрольных растений. Излом на термограмме у обработанных ДХММ растений наступает раньше, он более выражен. Торможение фотосинтеза, таким образом, способствовало увеличению повреждающего действия

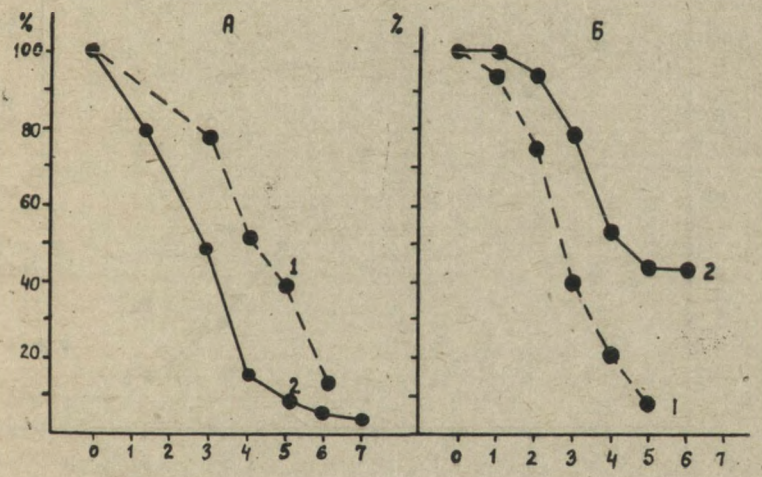


Рис. 2. Влияние диурона и АТФ на жаростойкость проростков пшеницы: А: *1* — контроль, 45 °С; *2* — ДХММ, $1 \cdot 10^{-5}$ М; Б: *1* — контроль, 45 °С; *2* — АТФ, $1 \cdot 10^{-3}$ М; по оси ординат — скорость тепловыделения, %

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

супероптимальной температуры, что выражается в снижении теплоустойчивости растительного организма как целого.

Иная картина наблюдается (рис 2, *Б*) при оптимизации энергообмена (при введении экзогенного АТФ на фоне супероптимальных температур). Скорость термогенеза значительно выше у опытных растений по сравнению с контрольными, и это понятно. Введением АТФ, по-видимому, достигается повышение резистентности многих структур и функций растительной клетки к действию экстремальной температуры. Возникает вопрос о возможности использования ФАС с целью повышения резистентности зеленой клетки к действию неблагоприятных факторов среды. Фактической основой для использования мивала (1-хлорметилсилатрана) в качестве средства, повышающего стойкость растения к действию экстремальной температуры, послужили данные о том, что биологически активные силатраны, утилизируемые растениями на определенных этапах онтогенеза, могут существенно влиять на рост и развитие ряда сельскохозяйственных культур, величину и качество их урожая [7].

На рис. 3 показана термограмма проростков пшеницы, семена которых были обработаны водным раствором мивала.

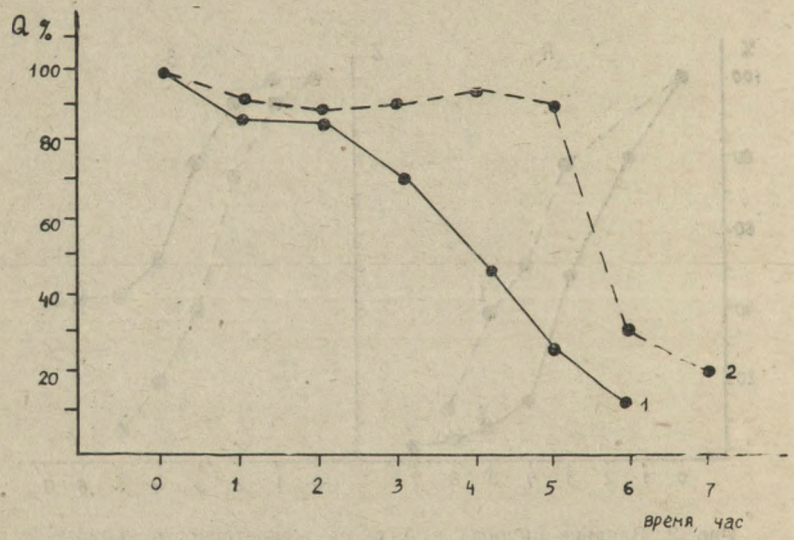


Рис. 3. Влияние мивала на теплоустойчивость проростков пшеницы: *1* — контроль, 43°; *2* — мивал, 0,025%

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Обращает на себя внимание тот факт, что в результате обработки мивалом происходит определенная стабилизация тепловыделения (подобно добавлениям АТФ), скорость которого снижается на 10—15% и поддерживается на относительно неизменном уровне в течение всего времени прогрева.

Из рис. 4 видно, что в ходе тепловой обработки (45 °С, 60 мин) одновозрастных растений скорость фотосинтеза снижается примерно вдвое, в то время как у обработанных мивалом растений снижение фотосинтеза несущественно. В то же время в оптимальных для растений температурных условиях действие мивала не проявляется.

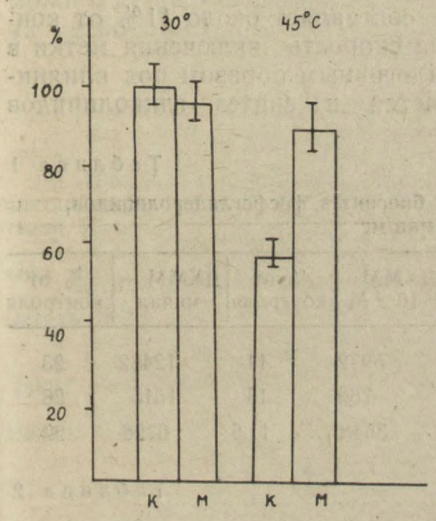


Рис. 4. Влияние мивала на жаростойкость фотосинтеза проростков пшеницы

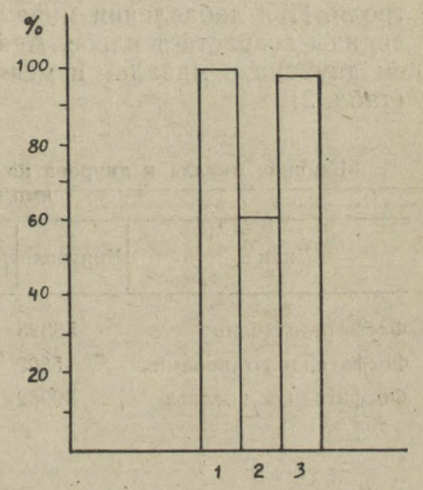


Рис. 5. Влияние мивала и диурона на фотосинтез проростков пшеницы: *1* — контроль; *2* — диурон, $1 \cdot 10^{-5}$ М; *3* — диурон + мивал, 0,015%

Механизм протекторного действия мивала пока неясен, и литературных данных на этот счет нет. Определенную информацию о месте его действия можно получить, очевидно, при использовании соединений, механизм действия которых на растительную клетку достаточно известен. В частности, ранее упоминалось, что в работе был использован диурон. Мивал снижает ингибирующий эффект диурона на скорость фотосин-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

теза, что делает логичным предположение, что данное соединение оказывает влияние на электрон-транспортную цепь фотосинтеза на участке, чувствительном к диурону (рис. 5). Однако этот вопрос требует дальнейших исследований.

Определенный вклад в выяснение механизма действия мивала на растение может внести изучение его влияния на метаболизм ассимилирующей клетки и биосинтез липидов, химическое строение и пространственная ориентация которых во многом определяют физиологическую лабильность и функциональную активность внутриклеточных мембран. Как видно из данных, приведенных в табл. 1, диурон значительно подавляет синтез всех идентифицированных в работе фосфоглицеролипидов, радиоактивность которых составляет около 11% от контроля. При добавлении мивала скорость включения метки в липиды возрастает вдвое. Аналогичным образом под влиянием диурона и мивала изменяется и синтез гликолипидов (табл. 2).

Таблица 1

Влияние мивала и диурона на биосинтез фосфоглицеролипидов, имп/мин/мг

Липид	Контроль	ДХММ $1 \cdot 10^{-5}$ М	% от контроля	ДХММ + мивал	% от контроля
Фосфатидилхолин	53828	5972	11	12482	23
Фосфатилдилэтаноламин	5802	760	13	1615	28
Фосфатидная кислота	30982	3548	11,5	6726	22

Таблица 2

Влияние мивала и диурона на биосинтез гликолипидов, имп/мин/мг

Липид	Контроль	ДХММ $1 \cdot 10^{-5}$ М	% от контроля	ДХММ + мивал	% от контроля
Дигалактозилдиадилглицерин	7796	1860	24	3031	39
Моногалактозилдиацилглицерин	9205	1548	17	3268	35,5
Сульфохиновозилдиацилглицерин	14060	—	—	—	—

Введение мивала приводит к снижению ингибирующего эффекта диурона, а следовательно, и к улучшению энерго-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

обеспечения растительных клеток; почти вдвое возрастает биосинтез полярных глицеролипидов.

Полученные данные позволяют заключить, что мивал оказывает влияние на мембранную структуру фотосинтетического аппарата зеленой клетки, тем самым стабилизируя их фотосинтетическую функцию.

Не располагая достаточным экспериментальным подтверждением, можно лишь предполагать, во-первых, мембраннотропное действие этого регулятора роста, следствием которого являются стабилизация мембранной системы клеток и более высокая термоустойчивость фотосинтетической функции. Возможно, действие мивала может быть связано с его влиянием на метаболизм и энергетический обмен растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кальве Э., Прат А. Микрокалориметрия. — М.: ИЛ, 1963. — 477 с.

2. Петров В. Е., Лосева Н. Л. Энергетика ассимилирующей клетки и фотосинтез. — В кн.: Энергетические аспекты устойчивости растений. Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1986, с. 197.

3. Жолкевич В. Н. Энергетика дыхания высших растений в условиях водного дефицита. — М.: Наука, 1968. — 203 с.

4. Чулановская М. В., Семихатова О. А. Манометрические методы исследования дыхания и фотосинтеза. — Л.: Наука, 1965.— 304 с.

5. Кейтс М. Техника липидологии. — М.: Мир, 1975. — 340 с.

6. Сагатов З. С. Влияние высоких температур на энергетику дыхания растений. Автореф... канд. биол. наук. — М., 1981.— 21 с.

7. Воронков М. Г., Дьяков В. М. Силатраны. — Новосибирск: Наука, 1978. — 205 с.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В СИСТЕМЕ ХЛОРОПЛАСТ — ПЛАЗМАЛЕММА

Н. Г. Иванкина, В. А. Новак

Научно-исследовательский институт биологии и биофизики
при Томском университете

Цитоплазматическая мембрана — первая обращенная к среде структура, участвующая в сложных регуляторно-энергетических взаимодействиях клетки. Примером этого является эффект светоиндуцированной гиперполяризации плазмалеммы, обусловленной процессами фотосинтеза [1 и др.]. В соответствии с редокс-гипотезой H^+-помпы [2] активация, светом электрогенной системы в плазмалемме происходит за счет увеличения на свету уровня восстановленности пиридиннуклеотидов (НАД(Ф)Н) в клетке [3]. НАД(Ф)Н являются донорами электронов, кислород — конечным акцептором в плазмалеммной редокс-системе [2, 4—6]. Взаимоотношения между редокс-системой плазмалеммы, фотосинтезом, темновым дыханием, фотодыханием, гликолизом и другими энергопоставляющими и энергопотребляющими клеточными процессами находят, по-видимому, свое отражение в сложной картине индукционных переходов мембранного потенциала в ответ на включение и выключение света [7]. С другой стороны, изменение морфологического или функционального состояния плазмалеммы, например под влиянием мембранотропных агентов, также сказывается на работе внутриклеточных структур [8, 9].

В настоящей работе в экспериментах на листьях элодеи при одновременной регистрации мембранного потенциала (микроэлектродным способом) и фотосинтетического выделения кислорода (полярографическим методом с использованием платинового электрода) предпринята попытка исследовать взаимосвязь процессов, происходящих в хлоропластах и на плазмалемме, при различных модификациях внешних условий (интенсивность и длительность света, концентрация CO_2 и др.).

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

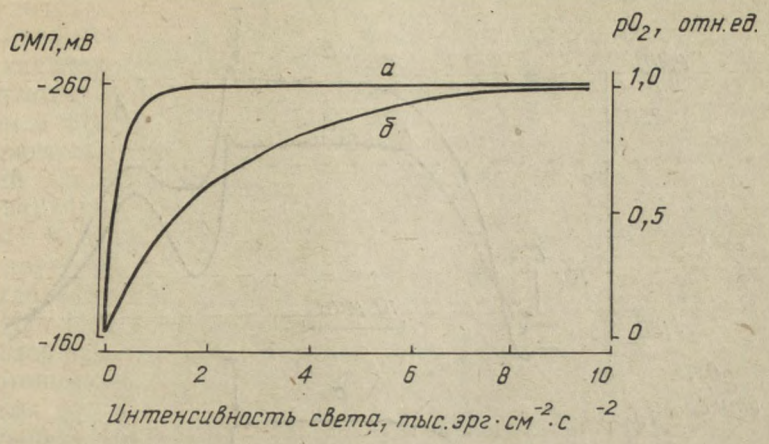


Рис. 1. Зависимость светоиндуцированного мембранного потенциала (*а*) и фотосинтетического выделения O_2 (*б*) листа элодеи от интенсивности падающего света (КС-13). Развертка по интенсивности света осуществлялась непрерывно в течение 100 мин

На рис. 1 приведены кривые зависимости pO_2 и светоиндуцированного мембранного потенциала (СМП) элодеи от интенсивности света. В отличие от кривой pO_2, для которой характерно монотонное нарастание при увеличении интенсивности света, для СМП наблюдается быстрое насыщение. Ранее при исследовании влияния на СМП элодеи кофакторов и ингибиторов фотосинтеза было сделано заключение, что СМП определяется процессами восстановления НАДФ в цепи нециклического транспорта электронов в хлоропластах [10]. Рядом авторов на изолированных хлоропластах показано, что при малых интенсивностях света скорость фотофосфорилирования имеет нелинейную зависимость от интенсивности света и медленное нарастание [11]. Скорость переноса электронов пропорциональна интенсивности света даже при самых низких значениях последней и имеет более крутой подъем. Учитывая это, результаты, приведенные на рис. 1, можно рассматривать как подтверждение предположения, что активная составляющая мембранного потенциала энергетически поддерживается НАД(Ф)Н, а не АТФ [2]. Вероятно, с этих же позиций можно объяснить тот экспериментальный факт, что при коротких импульсах света и более длительных периодах темноты (свет :

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

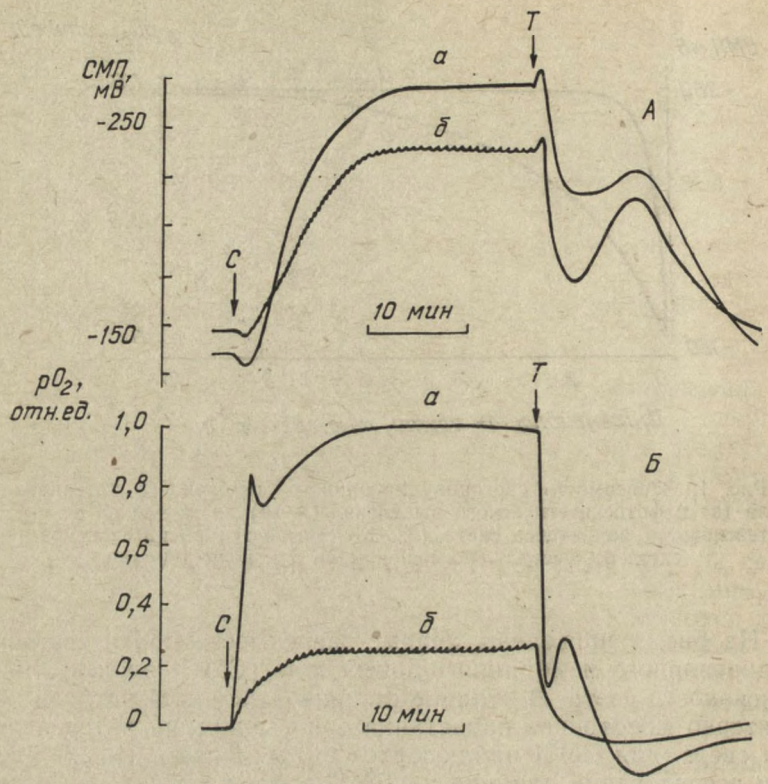


Рис. 2. Светоиндуцированные изменения мембранного потенциала (*А*) и фотосинтетического выделения O_2 (*Б*) листа элодеи при непрерывном освещении (*а*) и чередовании коротких импульсов света (2 с) и темноты (20 с, *б*). Интенсивность падающего света 10 тыс. эрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$; *С* — включение постоянного или импульсного освещения, *Т* — выключение света

темнота =2 : 20 с) СМП ближе к насыщающим значениям по сравнению с pO_2 (рис. 2).

По-разному реагируют СМП и pO_2 на изменение pH и концентрации CO_2 в среде. Однако необходимо отметить, что при работе с водными растениями возникают сложности разделения эффектов влияния pH и CO_2. При низких значениях pH (4—5) практически вся углекислота в растворе находится в форме физически растворенного CO_2 [12]. При сдвиге pH в

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

щелочную область соотношение между формами CO_2 и HCO_3^- изменяется в сторону анионной формы и при pH 8—9 вся углекислота находится в форме HCO_3^- [12]. Поглощение углекислоты из среды у водных растений осуществляется в основном в форме CO_2. При определенных условиях поглощение может происходить и в форме аниона HCO_3^-, но идет с меньшей скоростью [13], поэтому при обычном (уравновешенном с воздухом) содержании CO_2 в среде смещение pH из кислой (pH 4, 5) в щелочную область (pH 9,0) приводит более чем к двукратному снижению интенсивности фотосинтетического выделения O_2 (таблица). При этом наблюдается увеличение СМП. При исключении CO_2 из среды изменение pH не сказывается на pO_2, но по-прежнему сохраняется эффект увеличения потенциала в щелочной области (см. таблицу). Эти результаты согласуются с предложенной ранее схемой, характеризующей связь СМП с фотосинтезом (точнее процессами фиксации CO_2) как особую форму конкурентных взаимоотношений [10].

Влияние pH раствора на СМП и pO_2 у элодеи при обычном содержании ($+CO_2$) и отсутствии ($-CO_2$) в среде

Параметр	Условия опыта			
	pH 4,5		pH 9,0	
	$+CO_2$	$-CO_2$	$+CO_2$	$-CO_2$
СМП, мВ	136,4±3,2	157,3±5,0	188,1±8,6	191,7±8,4
pO_2, отн. ед.	55,6±3,0	34,6±3,4	24,4±1,2	28,1±3,3

Результаты, приведенные в настоящем сообщении, указывают на сложный характер взаимосвязи СМП с фотосинтезом и позволяют ставить вопрос о значении феномена светоиндуцированной гиперполяризации плазмалеммы для функционирования ассимилирующей клетки в целом.

«Мощность» плазмалеммной окислительно-восстановительной системы довольно велика, сравнима с «мощностью» основных метаболических процессов в клетке. Так, при оценке скорости транспорта электронов в редокс-системе плазмалеммы с помощью непроникающего в клетки акцептора электронов феррицианида (Fe^{3+}) для элодеи на свету получено значение 160 нмоль Fe^{3+}/г сыр. веса·мин [14]. Эта величина соизме-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

рима со скоростями транспорта калия (77 нмоль K^+/г сыр. веса·мин) и темнового дыхания у элодеи (50 нмоль O_2/г сыр. веса·мин). На основании таких сравнений плазмалеммную редокс-систему можно отнести к основным энергопотребляющим системам клетки, что необходимо во избежание ошибок учитывать при работе на целых органах и клетках. Так, например, усиление на свету работы плазмалеммной редокс-системы [15] можно ошибочно отнести к активации светом темнового дыхания, поскольку по начальному и конечному звену редокс-система плазмалеммы аналогична дыхательной цепи митохондрий [4].

Усиление на свету работы редокс-системы плазмалеммы [15], следствием чего является светоиндуцированная гиперполяризация последней, можно, вероятно, рассматривать как включение механизма, выполняющего в клетке роль «псевдоцикла». Псевдоциклический транспорт электронов в изолированных хлоропластах может составлять более 30% от общего потока электронов [16], и его значение сводится, по-видимому, к защите фотосинтетического аппарата от фотодеструкции. Предполагается, что псевдоциклический транспорт электронов in vivo может выступать регулятором соотношения АТФ/НАДФН [17], поскольку в соответствии со схемой Кальвина для самообеспечения фотосинтеза при фиксации одной молекулы CO_2 необходимо, чтобы это отношение было равно 3/2. Условно можно считать, что все процессы окисления избытка восстановителя выполняют в клетке роль «псевдоцикла», если конечным акцептором электронов является кислород. Поэтому окисление НАД(Ф)Н в редокс-системе плазмалеммы также можно рассматривать в качестве механизма, направленного на регуляцию в хлоропластах соотношения АТФ/НАДФН. Как известно, одним из условий, когда псевдоциклический транспорт электронов в хлоропластах становится заметным, — это избыток восстановленных продуктов фотосинтеза (например, при высоких интенсивностях света и дефиците CO_2). Такая же зависимость от концентрации CO_2 характерна для электрогенной системы плазмалеммы. Так, при обычном (уравновешенном с воздухом) содержании CO_2 в омывающем элодею растворе ($4 \cdot 10^{-5}$ М CO_2, pH 6,5) световая гиперполяризация плазмалеммы (разность между световым и темновым стационарными уровнями мембранного потенциала) составляет $138{,}7 \pm 11{,}7$ мВ. Увеличение концентрации CO_2 в растворе (до $2 \cdot 10^{-4}$ М CO_2, pH 6,5) при неизменной интенсивности света (около 10 тыс. эрг/см^2·с) при-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

водит к снижению мембранного потенциала до темнового уровня. Исключение CO_2 из среды, как уже говорилось, увеличивает светоиндуцированную гиперполяризацию (см. таблицу, pH 4,5).

В заключение необходимо отметить, что в отличие от псевдоциклического транспорта электронов в хлоропластах, при котором неизбежно происходит потеря энергии, результатом окисления НАД(Ф)Н в плазмалеммной редокс-системе, выполняющей на свету роль «псевдоцикла», является аккумуляция энергии в виде градиента мембранного потенциала и градиента pH на плазмалемме и поддержание необходимого для клетки уровня транспортных процессов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bentrup F. W. Lichtabhängige Membranpotentiale bei Pflanzen.— Ber. Deutsch. Bot. Ges., 1974, Bd. 87, S. 515.

2. Новак В. А., Иванкина Н. Г. Природа электрогенеза и транспорта ионов в растительных клетках. — ДАН СССР, 1978, т. 242, № 5, с. 1229.

3. Хебер У. Взаимодействие в системе хлоропласт — клетка. — В кн.: Теоретические основы фотосинтетической продуктивности. М.: Наука, 1972, с. 266.

4. Иванкина Н. Г., Новак В. А. Локализация редокс-реакций в плазмалемме клеток листа элодеи. — Studia biophysica, 1981, v. 83, N 3, p. 197.

5. Sijmons P. C., Briel W., Bienfait H. F. Cytosolic NADPH is the electron donor for extracellular Fe^{III} reduction in iron-deficient bean roots. — Plant Physiol., 1984, v. 75, p. 219.

6. Новак В. А., Иванкина Н. Г. Зависимость мембранного потенциала фотосинтезирующих растительных клеток от кислорода. — Цитология, 1978, т. 20, № 8, с. 896.

7. Новак В. А., Иванкина Н. Г. Светоиндуцированные изменения внутриклеточного электрического потенциала листа элодеи как отражение взаимоотношений между фотосинтезом и дыханием. — В кн.: Управление скоростью и направленностью биосинтеза у растений. Красноярск, 1973, с. 28.

8. Новак В. А., Иванкина Н. Г. Влияние нитро-синего тетразолия на мембранный потенциал и транспорт ионов у элодеи. — Физиология растений, 1983. т. 30, вып. 6, с. 1107.

9. Иванкина Н. Г., Мухамадияров Р. А., Веселова Г. Г. Токсическое действие солей тяжелых металлов на растительную клетку. — В кн.: Материалы научно-практической конференции молодых ученых. Томск, 1980, с. 113.

10. Новак В. А., Иванкина Н. Г. Зависимость светоиндуцированного внутриклеточного электрического потенциала элодеи от процессов фотосинтеза. — Цитология, 1977, т. 19, № 5, с. 508.

11. Демидов Э. Д., Белл Л. Н. О световом пороге фотофосфорилирования в изолированных хлоропластах. — Физиология растений, 1977, т. 24, вып. 2, с. 424.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

12. Lucas W. J. Photosynthetic fixation of ^{14}carbon by internodal cells of Chara corallina. — J. Experim. Botany, 1975, v. 26, N 92, p. 331.

13. Smith F. A. Rates of photosynthesis in characean cells. II. Photosynthetic $^{14}CO_2$ fixation and ^{14}C-bicarbonate uptake by characean cells. — J. Experim. Botany, 1968, v. 19, N 58, p. 207.

14. Новак В. А., Иванкина Н. Г. Клеточный уровень АТФ, транспорт калия и электрические характеристики плазмалеммы элодеи при действии феррицианида. — ДАН СССР, 1986, т. 286, № 2, с. 498.

15. Новак В. А., Миклашевич А. И. Феррицианидредуктазная активность листьев элодеи и ее связь с энергетическим метаболизмом. — Физиология растений, 1984, т. 31, вып. 3, с. 489.

16. Шмелева В. Л., Иванов Б. Н., Битюкова Л. В. Светозависимое поглощение кислорода изолированными хлоропластами гороха при фотовосстановлении НАДФ$^+$. — Биохимия, 1979, т. 44, вып. 5, с. 911.

17. Иванов Б. Н., Поваляева Т. В. Псевдоциклический транспорт электронов при фотовосстановлении НАДФ$^+$ изолированными хлоропластами гороха. — Физиология растений, 1979, т. 26, вып. 2, с. 276.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

СВЯЗЬ СВЕТОЗАВИСИМЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В СИСТЕМЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ С ПРОЦЕССОМ ДЫХАНИЯ

Г. Н. Чупахина, Т. Л. Хлебодарова

Калининградский государственный университет

В проростках ячменя на свету увеличивается уровень восстановленной формы аскорбиновой кислоты (АК), но продукты последующих ее превращений — дегидроаскорбиновая (ДГАК) и дикетогулоновая кислоты (ДКГК) неоднозначно реагируют на освещение: при уменьшении содержания ДГАК увеличивается ДКГК [1]. Стимуляция светом накопления АК и ДКГК имеет место в митохондриях [2] и альбиносных проростках ячменя [1], что дает основание связывать данный процесс с дыханием и скорее всего с теми его реакциями, которые не подавляются на свету [3]. Связь светозависимых изменений в системе АК с процессом дыхания может осуществляться через систему дыхательных ферментов, окисляющих АК. Наличие ее исследовалось в данной работе на примере пероксидазы, одна из изоформ которой — аскорбатпероксидаза — непосредственно окисляет АК [4]:

$$АК + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + ДГАК.$$

Объектом исследования служили зеленые, этиолированные и альбиносные 7—10-дневные проростки ячменя, полученные при обработке семян стрептомицином, ингибирующим 30S-субъединицы 70S рибосом [1]. Такие проростки имеют пигментированную верхушку длиной около 20 мм, среднюю часть (около 7 мм) визуально желтую и нижнюю — альбиносную. Вырезки из белых участков листьев использовались в опытах. В связи с этим возникла необходимость определить пероксидазную активность в аналогичных участках зеленых и этиолированных листьев (табл. 1). Активность пероксидазы определялась фотометрически [5].

Исследования показали, что пероксидазная активность практически одинакова по всей длине этиолированных листьев. У зеленых она максимальна в нижней части листа, но наи-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

большая гетерогенность в распределении ферментативной активности — у альбиносов, для которых характерен и самый высокий уровень ее по всем зонам по сравнению с зелеными и этиолированными проростками. Прослеживается обратная зависимость в содержании зеленых пигментов и активности пероксидазы. В работе Гусева и др. [6] указывается, что при нарушении биосинтетических функций листа, в том числе свя-

Таблица 1

Пероксидазная активность различных зон зеленых, этиолированных и альбиносных листьев ячменя (ΔД, с/г)

Зона	Зеленые	Этиолированные	Альбиносные
Верхняя	14,00±0,84	15,61±0,61	21,60±0,39
Средняя	14,45±0,85	16,04±0,60	24,53±0,85
Нижняя	17,07±0,41	16,91±0,36	31,98±1,10

занных с накоплением хлорофилла, число молекулярных форм пероксидазы и активность некоторых из них увеличивается. Выполненная нами работа по исследованию изоформ пероксидазы у альбиносов [7] также показала увеличение активности одной из них. Данный факт, вероятно, можно объяснить тем, что при ингибировании биосинтеза зеленых пигментов, а в конечном итоге фотосинтеза, начинает срабатывать эффект взаимозаменяемости энергетических процессов, происходит активация второго энергодающего процесса — дыхания — и некоторых дыхательных ферментов, в частности, пероксидазы.

Свет повышает активность пероксидазы у зеленых растений [8]. По нашим данным, это имеет место и у альбиносов. Для определения спектра поглощения возможного фоторецептора, ответственного за светозависимую стимуляцию пероксидазной активности, исследовалось действие света различного спектрального состава на данный процесс (табл. 2). В опытах использовались срезанные и помещенные на воду листья, процедура срезания способствовала активации пероксидазы. Реакция на освещение монохроматическим зеленым и синим светом была одинакова у всех типов проростков: зеленый свет повышал, а синий снижал активность фермента. Красный свет активировал пероксидазу только в этиолированных про-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ростках, у других — снижал ее. Пероксидаза как гемпротеид поглощает свет в нескольких областях спектра. Например, пероксидаза хрена адсорбирует свет с длиной волны 410—430, 498, 583, 645 нм [9]. Учитывая спектр поглощения молекулы

Таблица 2

Действие света различного спектрального состава на активность пероксидазы в проростках ячменя **(экспозиция 2 ч, интенсивность света 4,4 тыс. эрг/см²·с⁻¹)**

Условия опыта	Зеленые	Этиолированные	Альбиносные
В темноте	15,04±0,40	9,42±0,12	27,26±1,13
На красном свету (620—740 нм)	11,82±0,46	11,93±0,13	19,41±1,46
На белом свету	16,45±0,15	14,40±0,36	33,50±1,21
В темноте	9,92±0,21	16,31±0,22	28,99±0,45
На синем свету (440—520 нм)	9,01±0,16	13,07±0,32	23,97±0,25
В темноте	15,51±0,23	19,50±0,36	23,26±0,74
На зеленом свету (480—600 нм)	17,72±0,19	20,24±0,32	26,94±1,27

пероксидазы, можно предположить, что непосредственным акцептором света в светозависимом изменении ее активности может выступать сама молекула фермента, тонкая регуляция активности которой осуществляется светом определенного спектрального состава.

Таким образом, связанные с дыханием светозависимые изменения в системе АК определяются в основном новообразованием ее, повышающим пул, несмотря на одновременную активацию светом некоторых окисляющих аскорбат ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чупахина Г. Н., Окунцов М. М., Архипова Н. Д. Биосинтез аскорбиновой, дегидроаскорбиновой и дикетогулоновой кислот листьями ячменя при ингибировании биосинтеза пигментов стрептомицином.— Физиология растений, 1978, т. 25, вып. 6, с. 1179.

2. Чупахина Г. Н., Залящева М. В., Сивцова А. М. Субклеточная локализация аскорбиновой, дегидроаскорбиновой и дикетогулоновой кислот в листьях ячменя в связи с освещением: Тезисы докл. Всес. конф. «Проблемы фотоэнергетики растений и повышение урожайности». Львов, 1984, с. 69.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

3. Филиппова Л. А., Мамушина Н. С., Зубкова Е. К. и др. Взаимоотношения фотосинтеза и дыхания у ассимилирующих клеток в разных зонах растущего листа ячменя.— Физиология растений, 1986, т. 33, вып. 1, с. 66.

4. Foyer Ch., Rowell J., Walker D. Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. — Planta, 1983, v. 157, N 3, p. 239.

5. Гавриленко В. Ф., Ладыгина М. Е., Хандобина Л. М. Большой практикум по физиологии растений. — М.: Высшая школа, 1975, с. 284.

6. Гусев М. В., Карташова Е. Р., Руденская Г. Н. и др. Пероксидазно-ИУК-оксидазный комплекс листьев арабидопсиса, различающихся по содержанию хлорофилла: — Тезисы докл. Международного симпозиума «Регуляция метаболизма первичных и вторичных продуктов фотосинтеза». Пущино, 1983, с. 65.

7. Чупахина Г. Н., Христин М. С., Кузнецова Л. Г. Влияние стрептомицина на биогенез белков хлоропласта и функциональную активность листа ячменя. — Физиология и биохимия культурных растений, 1985, т. 17, № 5, с. 444.

8. Reddy K. P., Subhani S. M., Khan P. A., Kumar K. B. Effect of light and benzyladenine on darktreated growing rice (Oryza sativa) leaves. 2. Changis in peroxidase activity. — Plant and Cell Physiol., 1985, v. 26, N 6, p. 987.

9. Рубин Б. А., Ладыгина М. Е. Физиология и биохимия дыхания растений. — М.: Изд-во МГУ, 1974, с. 80.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ФОРМИРОВАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ХВОЙНЫХ В ТЕМНОТЕ

А. П. Зотикова, Е. И. Симонова, Н. С. Новикова

Научно-исследовательский институт биологии и биофизики
при Томском университете

Процесс биосинтеза хлорофилла у покрытосеменных растений включает энзиматические и фотохимические реакции и в отсутствие света заканчивается на стадии образования его предшественника — протохлорофиллида. Представители семейства Pinaceae обладают уникальной способностью синтезировать хлорофилл в полной темноте. Известна решающая роль эндосперма в темновом образовании хлорофилла, который является источником энергии, заменяющим свет. В темноте молекула хлорофилла формируется с участием определенных метаболитных систем и в первую очередь дыхательных [1—2]. Темновое образование хлорофилла предполагает определенную специфику в развитии взаимосвязи структуры и функции хлоропласта, сформированного без участия света.

Целью настоящего исследования явилось выяснение особенностей формирования зеленых пигментов, их молекулярной организации и развития активности фотосистем у проростков хвойных в темноте.

Исследования проводили с 14-дневными проростками сосны обыкновенной и кедра сибирского, выращенных в лабораторных условиях в полной темноте или на белом свету. Методика выращивания растений, выделения хлоропластов, определения пигментов и активности реакции Хилла описана нами ранее [3]. Реакцию фотовосстановления НАДФ определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм в среде, содержащей в 3 мл: трис-HCl-буфер — 60 мкм; $MgCl_2$ — 5; аскорбат натрия — 30; ДХФИФ — 0,2; АДФ — 10; KH_2PO_4 — 10; НАДФ — 2 мкм; 60 мкг ферредоксина и суспензию хлоропластов с содержанием хлорофилла 20—40 мкг. В некоторых экспериментах вносили диурон в концентрации 0,035 М. Скорость фотовосстановления НАДФ рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции 0,1628. Вторые производ-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ные спектров поглощения хлорофилла измеряли на спектрофотометре фирмы Hitachi [4]. Результаты исследований обработаны статистически.

Ранее нами было показано, что проростки хвойных в темноте синтезируют хлорофилл (Хл) **a** и **b**, но их содержание значительно ниже, чем у световых растений, особенно уменьшается количество Хл **b** у сосны [3]. Логическим продолжением развития исследований пигментного аппарата хвойных представлялось изучение их внутримембранной организации. Измерение вторых производных спектров поглощения хлорофилла проростков сосны и кедра обнаружило образование всех форм хлорофилла, характерных для хлоропластов покрытосеменных растений, выращенных на свету (рис. 1). Максимум Хл **b** при 648 нм и четыре следующих коротковолновых максимума при длине волны 661, 670, 676 и 678 нм указывают на присутствие в семядолях кедра и сосны, сформированных в темноте, светособирающего Хл **a**/**b** белкового комплекса (ССК). Возможно, этот комплекс представлен в несколько редуцированном виде, так как темновые хвойные содержат

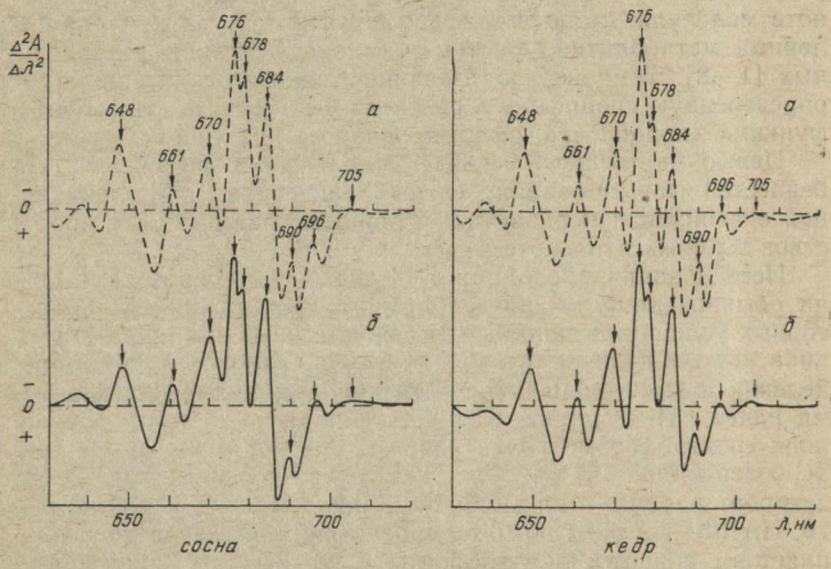


Рис. 1. Вторые производные спектров поглощения хлорофилла в хлоропластах световых (*а*) и темновых (*б*) проростков сосны и кедра при —196 °С

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

мало хлорофилла **b**. В работе [5] отмечается, что некоторые белковые компоненты, принимающие участие в сборке сложного по составу ССК, образуются и при отсутствии Хл **b** в этиопластных мембранах ячменя. Наличие Хл **a** с максимумом при 684 нм предполагает формирование у хвойных в темноте Хл **a**-белкового комплекса фотосистемы (ФС) II. На основании определения длинноволновых форм Хл **a** (690, 696, 705 нм) можно говорить о нормальном образовании Хл **a**-белкового комплекса ФС I (см. рис. 1).

Исследование функциональной активности сформированного в темноте фотосинтетического аппарата проростков сосны и кедра показало, что хлоропласты обладают скоростью электронного транспорта через всю фотосинтетическую цепь от воды к НАДФ, близкой к уровню световых вариантов (таблица). Диурон незначительно снижает скорость реакции

Фотохимическая активность хлоропластов сосны и кедра

Условия опыта	Объект	Акцептор электрона, мкмоль/мг хл·ч			
		НАДФ		$K_3Fe(CN)_6$	
		—Диурон	+Диурон	—ДФК	+ДФК
На свету	Сосна	47±3	33±1	183±27	189±36
	Кедр	59±2	42±1	135±13	Не опр.
В темноте	Сосна	26±5	25±1	7±3	139±33
	Кедр	43±3	37±2	24±1	Не опр.

фотовосстановления НАДФ пластид проростков сосны, что указывает на преимущественную активность у них ФС I. Для проростков кедра этот ингибитор в большей степени влияет на фотохимическую активность. Это предполагает, по-видимому, более высокий вклад ФС II в работу электронного транспорта темновых пластид кедра по сравнению с сосной.

При изучении фотовосстановления другого акцептора электронов — феррицианида — установлено, что хлоропласты темновых растений в отличие от световых содержат малоактивную ФС II (см. таблицу).

Существенные изменения в развитие электрон-транспортных реакций, катализируемых ФС II, вносит кратковременная световая экспозиция темновых семядолей на свету. Освещение проростков хвойных белым светом быстро стимулирует

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

реакцию Хилла (рис. 2), повышение активности которой не коррелирует с дополнительным синтезом хлорофилла [3]. Вероятно, активация электрон-транспортных реакций связана с конформационными изменениями в мембране, перегруппировкой молекул Хл и стэкингом. Искусственный донор электронов 1,5-дифенилкарбазид (ФДК) также усиливает фотохимическую активность темновых пластид сосны до уровня свето-

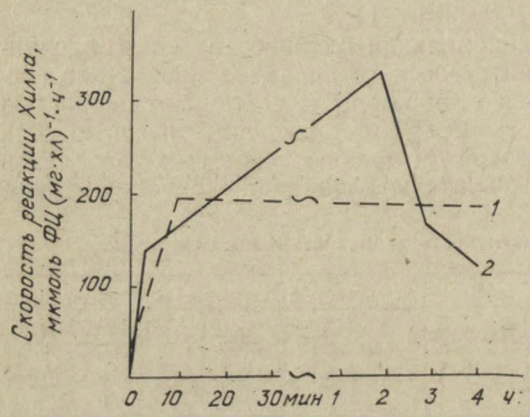


Рис. 2. Изменение фотохимической активности хлоропластов темновых проростков кедра (*1*) и сосны (*2*) на белом свету

вых вариантов (таблица). На сформированные в световых условиях хлоропласты ДФК аналогичного действия не оказывает. Отсюда следует, что у проростков в темноте формируется ФС II, содержащая, вероятно, активные реакционные центры с неустановленным транспортом электронов на водоразлагающем участке фотосинтетической цепи.

Таким образом, у проростков сосны и кедра в отсутствие света за счет темновых реакций формируется хлоропласт, содержащий все пигментбелковые комплексы, характерные для покрытосеменных растений, развивающихся в естественных условиях. Фотосинтетический аппарат темновых пластид хвойных по функциональным свойствам подобен покрытосеменным, выращенным при импульсном освещении: наблюдается высокая скорость реакций на уровне ФС I и низкая фотохимическая активность ФС II. Одним из возможных механизмов индукции электрон-транспортных реакций при кратковременном воздействии света на проростки сосны и кедра, сформированные в темноте, может быть фотоактивация кислородвыделяющей системы ФС II.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ЛИТЕРАТУРА

1. Рубин Б. А., Николаева Л. Ф. Изучение действия ингибиторов ферментов на дыхание хвойных в связи с особенностями зеленения. — Докл. АН СССР, 1962, т. 144, № 6, с. 1402.

2. Kasemir H. Light control of chlorophyll accumulation in higher plants. — Photomorphogenesis, 1983, v. 166, p. 662.

3. Симонова Е. И., Кудинова Л. И., Зотикова А. П. и др. Развитие функциональной активности хлоропластов проростков хвойных на свету и в темноте. — Физиология растений. 1984, т. 31, вып. 3, с. 442.

4. Ладыгин В. Г. Спектральные формы хлорофилла мутантов Chlamydomonas с неактивными фотосистемами. — Биофизика. 1979, т. 14, вып. 2, с. 254.

5. Абрамчик М. Л., Савченко Г. Е., Чайка М. Т. Идентификация белковых компонентов светособирающего комплекса фотосинтетической мембраны. — Докл. АН БССР, 1985, т. 24, № 5. с. 459.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

РЕГУЛЯЦИЯ ФОТОСИНТЕЗА И ДЫХАНИЯ ЦИТОКИНИНАМИ

И. И. Чернядьев, А. С. Образцов, А. Л. Козловских, Н. Г. Доман

Институт биохимии АН СССР
Всесоюзный научно-исследовательский институт кормов

Фотосинтетическая и дыхательная активность листа находится под контролем растительных гормонов, в частности цитокининов, которые оказывают многообразное и сложное действие на многие физиологические функции растения [1—4]. Особый интерес представляют исследования регуляторного влияния цитокининов на фотосинтез, во многом определяющего продуктивность растительного организма. Нами уже сообщалось о регуляторном действии цитокининов 6-бензиламинопурина и кинетина, а также обладающего цитокининовой активностью триазинового гербицида на фотосинтетический метаболизм углерода трех сортов сахарной свеклы, яровой пшеницы, гороха, фасоли, томатов, кукурузы, яблони, персика и черешни [5, 6]. В настоящей работе исследовали влияние соединений с цитокининовой активностью тидиазурона, который, являясь аналогом дифенилмочевины, вызывал дефолиацию хлопчатника за счет активации синтеза этилена [2], 6-бензиламинопурина и значительно отличавшегося от них по химической природе картолина, проявлявшего криопротекторное и засухоустойчивое действие [2], на фотосинтез и дыхание многолетних злаков.

Обработка использованных в качестве объекта исследования многолетних злаков первого года жизни овсяницы луговой сорта Дединовская-8 (диплоидная форма) и овсяницы тростниковидной сорта Мягколистная-7 (гексаплоидная форма) растворами цитокининов (20 мг/л 6-бензиламинопурина, 100 мг/л тидиазурона и 100 мг/л картолина-2), проведенная в фазу кущения, вызывала быстрое увеличение содержания хлорофиллов **a** и **b** и каротиноидов. Суммарное количество

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

хлорофиллов a+b возрастало после обработки тидиазуроном на 7—14%, картолином — на 20—25% и 6-бензиламинопурином — на 25—40%. Однако при этом величина отношения хлорофиллов a/b изменялась мало. При этом возрастали интенсивность фотосинтеза (в 1,3—1,8 раза) и темнового дыхания (в 1,2—1,4 раза).

Как видно из табл. 1 и 2, тидиазурон, картолин и 6-бензиламинопурин в разной степени вызывали увеличение активности ключевого фермента фотосинтеза рибулозодифосфат-карбоксилазы (КФ 4. 1.1.39) и другого специфического для восстановительного пентозофосфатного цикла фермента — НАДФ-глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (КФ 1.2.1.13) при расчете на единицу веса, единицу площади листа и на 1 лист, причем статистический анализ подтвердил достоверность различий через 3 и 10 суток после обработки. Изменения активности фосфоенолпируват-карбоксилазы (КФ 4.1.1.31) были невелики и статистически не достоверны. Прямые и косвенные данные, полученные в последнее время [2, 6] о стимулирующем действии цитокининов на синтез рибулозодифосфат-карбоксилазы de novo, дают возможность полагать, что наблюдавшееся в наших опытах увеличение активности могло быть связано с возрастанием количества этих ферментов после обработки листьев цитокининовыми препаратами. Влияние цитокининов на активность глицеральдегидфосфатдегидрогеназы было впервые показано нами на листьях сахарной свеклы [5].

Следует отметить, что у обоих видов многолетних злаков отличия в степени влияния различных цитокининов на активность ферментов фотосинтеза in vivo были меньше, чем на активность фотосинтетических ферментов in vitro. Однако уровень их активности как в обработанных, так и в необработанных листьях овсяницы тростниковидной был в 2,5—4 раза выше, чем у овсяницы луговой, что было связано, вероятно, с различиями в степени плоидности.

Итак, после обработки цитокининами возрастал пигментный фонд листьев, позволявший повысить эффективность первичных реакций фотосинтеза и обеспечить большую скорость темновых процессов, что подтверждалось возрастанием интенсивности фотосинтеза и активности фотосинтетических ферментов.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Влияние цитокининов на активность

Сутки	Условия опыта	Рибулозодифосфат-карбоксилаза		
		1	2	3
3	Контроль	1,5±0,1	7,2±0,1	59,6±1,1
	Тидиазурон	1,6±0,1	7,7±0,2	64,7±1,7
	Картолин	2,0±0,1	9,2±0,3	82,8±2,5
	БАП	2,2±0,1	10,8±0,5	103,7±5,7
10	Контроль	1,9±0,1	9,5±0,3	88,3±2,5
	Тидиазурон	2,5±0,2	10,8±0,6	119,8±7,0
	Картолин	3,0±0,2	12,1±0,6	134,3±6,8
	БАП	3,0±0,2	10,6±0,7	136,1±7,3
20	Контроль	1,1±0,1	5,9±0,7	87,9±3,1
	Тидиазурон	1,1±0,1	6,7±0,6	112,2±10,4
	Картолин	1,3±0,1	8,3±0,5	129,9±11,7
	БАП	1,1±0,1	5,5±0,3	88,9±8,0

Примечание. Здесь и в табл. 2: 1 — мкмоль/г·сухой массы·мин; 2 — мкмоль/дм^2 площади листа·мин; 3 — мкмоль/1 лист·ч; БАП — 6-бензиламинопурин.

Влияние цитокининов на активность ферментов

Сутки	Условия опыта	Рибулозодифосфат-карбоксилаза		
		1	2	3
3	Контроль	1,8±0,1	10,8±0,7	180,1±11,0
	Тидиазурон	2,5±0,2	13,3±1,3	230,6±22,1
	Картолин	2,5±0,2	13,6±1,3	241,5±23,0
	БАП	2,8±0,2	14,7±1,4	272,6±26,1
10	Контроль	2,4±0,1	13,1±0,5	232,6±9,0
	Тидиазурон	3,6±0,2	18,1±1,5	369,2±21,2
	Картолин	3,3±0,2	19,2±1,7	413,7±30,2
	БАП	3,6±0,2	18,3±1,5	384,3±32,0
20	Контроль	1,8±0,1	13,8±0,8	303,9±17,4
	Тидиазурон	2,2±0,2	19,5±1,5	552,2±41,4
	Картолин	2,4±0,2	20,0±0,6	624,7±49,9
	БАП	1,8±0,1	14,3±0,8	343,2±19,6

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Таблица 1

рментов листьев овсяницы луговой

Фосфоенолпируват-карбоксилаза			Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа		
1	2	3	1	2	3
0,3±0,1	1,0±0,2	8,3±1,6	6,1±0,3	28,5±3,0	236,0±20,2
0,3±0,1	1,2±0,2	10,1±1,4	7,7±0,4	37,2±4,7	312,5±26,7
0,3±0,1	1,1±0,2	9,5±1,6	10,0±0,8	46,7±5,6	420,3±41,0
0,4±0,1	1,3±0,2	13,0±2,0	10,0±0,8	49,0±4,8	470,4±41,2
0,3±0,1	1,3±0,2	12,1±0,9	8,5±0,6	42,4±3,7	394,3±34,4
0,3±0,1	1,0±0,2	11,2±1,7	15,0±1,1	61,0±6,1	684,4±68,0
0,3±0,1	1,1±0,2	12,2±2,2	14,7±1,1	58,1±7,0	644,9±70,8
0,4±0,1	1,5±0,3	15,2±3,0	14,9±1,2	65,0±6,8	702,0±73,4
0,3±0,1	0,9±0,1	13,0±2,3	7,0±0,4	41,1±3,1	606,6±44,3
0,3±0,1	1,1±0,2	19,1±3,4	6,8±0,4	40,2±5,9	697,1±70,1
0,3±0,1	0,9±0,1	16,2±0,9	7,9±0,5	54,1±4,8	772,1±69,5
0,3±0,1	1,0±0,2	17,3±1,4	6,7±0,4	35,6±3,2	574,6±51,7

Таблица 2

листьев овсяницы тростниковидной

Фосфоенолпируват-карбоксилаза			Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа		
1	2	3	1	2	3
0,6±0,1	2,4±0,4	40,0±6,6	11,5±0,9	62,3±8,1	1039,1±110,1
0,6±0,1	2,1±0,3	36,4±5,2	16,9±1,4	89,9±14,1	1564,3±109,0
0,7±0,1	2,6±0,4	46,1±7,1	19,0±1,4	104,1±16,1	1848,8±114,1
0,6±0,1	2,3±0,3	44,1±5,7	21,5±2,0	114,2±17,0	2192,6±206,1
0,6±0,1	2,4±0,3	42,6±5,3	14,2±1,1	74,5±10,7	1323,1±106,7
0,8±0,1	2,8±0,4	57,1±7,1	23,0±2,1	113,3±10,7	2311,3±106,1
0,6±0,1	2,3±0,3	49,7±7,0	22,1±2,0	123,3±10,0	2661,1±206,9
0,7±0,1	2,9±0,5	58,9±9,5	22,8±2,0	115,1±15,0	2417,1±200,1
0,5±0,1	1,3±0,2	28,6±1,0	12,6±1,0	111,7±13,9	2462,9±310,6
0,5±0,1	2,0±0,4	56,6±11,2	13,0±1,1	114,7±14,0	3249,7±391,9
0,6±0,1	2,0±0,3	62,1±12,2	13,7±1,1	114,3±13,4	3552,4±325,1
0,5±0,1	1,5±0,2	36,0±4,8	12,0±0,9	76,4±8,9	1833,5±193,0

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ЛИТЕРАТУРА

1. Уоринг Ф., Филлипс И. Рост растений и дифференцировка. — М.: Мир, 1984. — 512 с.

2. Кулаева О. Н. Фитогормоны как регуляторы активности генетического аппарата и синтеза белка у растений. — В кн.: Новые направления в физиологии растений. М.: Наука, 1985, с. 62—84.

3. Кулаева О. Н. Цитокинины, их структура и функция. — М.: Наука, 1973. — 264 с.

4. Mothes K. The role of kinetin in plant regulation. — Collog. Intern. CNPS, 1964, v. 123, N 1, p. 131—141.

5. Чернядьев И. И., Фриедрих А., Вольфова А., Хвойка Л., Доман Н. Г. Влияние соединений с цитокининовой активностью на фотосинтез сельскохозяйственных растений. — Прикл. биохимия и микробиол., 1984, т. 20, № 1, с. 107.

6. Чернядьев И. И. и др. Об участии цитокининов в регуляции фотосинтеза. — Физиол. и биохимия культ. растений, 1985, т. 17, № 1, с. 29—34.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ВЛИЯНИЕ ДЕФИЦИТА ЖЕЛЕЗА НА ФОТОСИНТЕЗ И ТЕМНОВОЕ ДЫХАНИЕ ЛИСТЬЕВ ГОРОХА

О. Н. Ладыгина, Д. А. Закржевский

Институт почвоведения и фотосинтеза АН СССР

Нормальный рост и развитие растений зависят от сбалансированного питания, в особенности по микроэлементам. Дефицит или избыток одного из них может приводить к нарушению оптимального соотношения элементов в питательной среде и в обмене веществ растений [1]. Следствием этого чаще всего является деструкция фотосинтетического аппарата и хлороз листьев.

Цель работы состояла в том, чтобы установить, как влияет в онтогенезе усиливающийся дефицит железа в питательной среде на содержание пигментов в хлоропластах, фотосинтез и темновое дыхание растений гороха в контролируемых условиях выращивания.

Методика

Работу проводили на листьях гороха (Pisum sativum L.), выращенного в климатической камере ШКВ-1 на полной среде Арнона (контрольный вариант) и без добавления железа (вариант по дефициту железа) в течение 25—30 суток при температуре 25° днем и 20 °С ночью, освещенности 80 Вт/м^2 и продолжительности светового периода 12 ч. В опыт брали 4—7-ю пары листьев, поскольку на каждый последующий лист эффект дефицита железа усиливался.

Содержание пигментов определяли спектрофотометрически в 100% ацетона при 4 °С. Спектры поглощения пигментов записаны на спектрофотометре СФ-14 при 21 °С. Флуоресценцию анализировали при —196 °С на установке СФЛ-1, собранной на основе двух монохроматоров SPM-2. Флуоресценцию хлорофилла возбуждали синим светом с длиной волны 480 нм, а регистрировали в области 600—800 нм. Фотосинтез и дыхание измеряли амперометрическим методом по O_2 с по-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Содержание пигментов в листьях гороха,

Условия опыта	мг/г сырой массы	
	Сумма хлорофиллов (a+b)	Сумма каротиноидов (c+x)
Контроль, Fe норма	2,52±0,32	0,56±0,08
Зеленый лист № 5	1,44±0,25	0,29±0,06
Светло-зеленый лист № 6	0,67±0,15	0,15±0,04
Желтый лист № 7	0,35±0,20	0,10±0,06

мощью платинового электрода Кларка. Измерения проводили при температуре 21° и насыщающей интенсивности света 400 Вт/м².

Результаты и обсуждения

Исследования содержания пигментов показали, что их количество в начале онтогенетического развития опытных растений вплоть до формирования 4-го листа практически не изменяется, но образующийся 5-й лист накапливает около 70% хлорофилла в сравнении с аналогичным листом в контроле

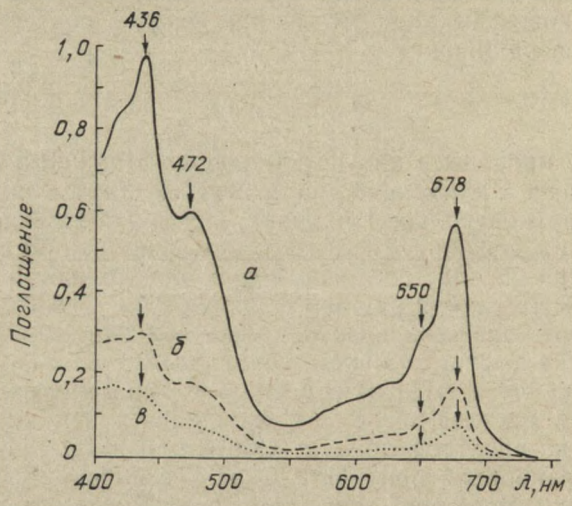


Рис. 1. Спектры поглощения пигментов при 23 °С контрольного листа (*а*), а также светло-зеленого № 6 (*б*) и желтого № 7 (*в*) листьев гороха, выросших при дефиците железа

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

выращенного при дефиците железа

мг/дм² площади листа		Хл. a / Хл. b	Хл. (a+b) / Кар. (c+x)
Сумма хлорофиллов (a+b)	Сумма каротиноидов (c+x)		
5,23±1,30	1,16±0,11	3,3—3,6	4,5—4,6
2,85±0,22	0,56±0,03	3,2—4,1	5,0—5,1
1,15±0,21	0,27±0,01	3,2—3,8	4,3—4,5
0,48±0,18	0,13±0,05	3,8—4,0	3,5—3,7

(таблица). В процессе дальнейшего развития растения хлороз быстро прогрессирует, и содержание хлорофилла у 6-го листа снижается до 25%, а у 7-го — до 10—15% от контрольного (рис. 1). Этот факт однозначно свидетельствует о значительной редукции в хлоропластах хлорофилл-белковых комплексов.

Известно, что каждый хлорофилл-белковый комплекс имеет характерные для него полосы излучения низкотемпературной флуоресценции [2]. Полученные нами спектры излучения показали (рис. 2), что как в листьях контроля, так и в листьях

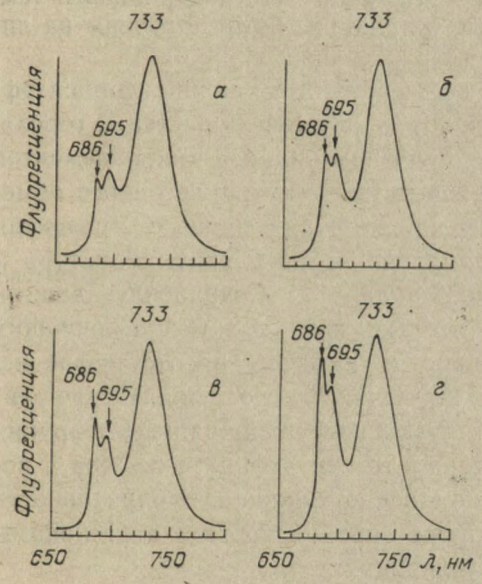


Рис. 2. Спектры флуоресценции хлорофилла при —196 °С контрольного листа (*а*), а также зеленого № 5 (*б*), светло-зеленого № 6 (*в*) и желтого № 7 (*г*) листьев гороха, выросших при дефиците железа

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

растений, росших при дефиците железа, по-видимому, сохранились все типы комплексов, но их количество и взаимодействие изменились. Значительно усилилось свечение комплекса ФС-11 (полосы при 686 и 695 нм), причем в большей мере увеличилось свечение полосы при 686 нм. Такое усиление полосы излучения при 686 нм наблюдали и другие исследователи [3, 4] у цианобактерий и высших растений, как при дефиците железа, так и при других неблагоприятных условиях выращивания. Длинноволновая полоса флуоресценции у всех листьев практически не изменилась, что указывает на большую стабильность ФС-1 и ее светособирающего комплекса.

Исследования фотосинтеза и темнового дыхания в листьях контрольных растений и опытных с возрастающим действием дефицита железа показало, что уже в 4-м листе снижаются темновое дыхание и скорость фотосинтеза до 60% (рис. 3). В дальнейшем снижается содержание пигментов в листьях и одновременно фотосинтетическая способность в 5-м, 6-м и 7-м листьях до 50, 30 и 16% соответственно. Интенсивность темнового дыхания изменяется менее значительно, хотя тенденция к снижению также наблюдается. Уменьшение содержания хлорофилла почти в 10 раз у желтых листьев (см. таблицу) все же обеспечивает сохранение фотосинтетической способности хлоропластов на уровне 15—20% от контрольного (см. рис. 3). Ранее аналогичные результаты были получены на листьях свеклы [5].

Подводя итог, можно заключить, что усиливающийся эффект дефицита железа в процессе онтогенеза растений гороха, по-видимому, приводит к нарушению баланса микроэлементов в клетках растений и, как следствие, внутриклеточного обмена веществ в целом. В конечном счете в процессе развития растений нарушаются формирование пигментов, структура и функция фотосинтетического аппарата. Сохранение даже в желтых листьях всех основных компонентов, обеспечивающих фотосинтетическую способность, указывает на отсутствие избирательной специфичности в механизме повреждающего действия дефицита железа. Структурно-функциональные нарушения фотосинтетического аппарата при дефиците железа и вообще микроэлементов существенно снижают продуктивность растений, поэтому очень важно оптимизировать этот показатель в производственных условиях.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

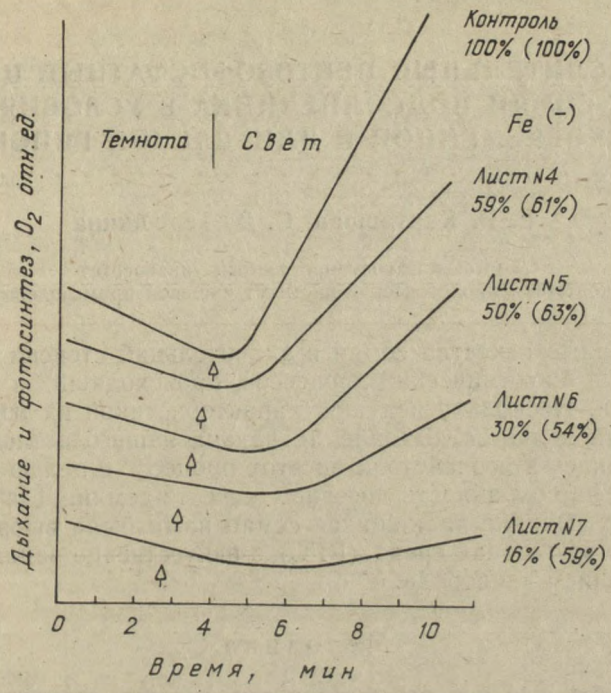


Рис. 3. Кинетика темнового дыхания и фотосинтеза при 21 °С контрольного листа и 4—7-го листьев гороха, выросших при дефиците железа. Стрелкой показан момент включения света

ЛИТЕРАТУРА

1. Ринкис Г. Я., Ноллендорф В. Ф. Сбалансированное питание растений макро- и микроэлементами. — Рига: Зинатне, 1982. — 301 с.

2. Ладыгин В. Г., Лебедев Н. Н. Спектры флуоресценции хлорофилла фотосистемы I, фотосистемы II и светособирающего комплекса в клетках Chlamydomonas reinhardii. — Молекул. биология, 1986, т. 20, № 2, с. 407—414.

3. Guikema J. A., Sherman L. A. Organization and function of chlorophyll in membranes of Cyanobacteria during iron starvation. — Plant Physiol., 1983, v. 73, N 2, p. 250—256.

4. Böddi B., Cheh E., Lang F. Fluorescence spectroscopy of iron-deficient plants. — J. Plant Physiol., 1985, v. 118, N 5, p. 451—461.

5. Terry N. Limiting factors in photosynthesis. I. Use of iron stress to control photochemical capacity in vivo. — Plant Physiol., 1980, v. 65, N 1, p. 114—120.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ ПЕНТОЗОФОСФАТНЫЙ ЦИКЛ У СЕМЯН ПОДСОЛНЕЧНИКА В УСЛОВИЯХ КРАТКОВРЕМЕННОЙ И ДЛИТЕЛЬНОЙ ГИПОКСИИ

Е. Р. Карташова, С. Д. Терешкина

Московский государственный университет
Московский технологический институт пищевой промышленности

Посевные качества семян в значительной степени зависят от уровня биохимических процессов, происходящих в них при хранении. Поскольку ведущей характеристикой их жизнедеятельности является дыхание, то задача нашего исследования заключалась в воздействии на этот процесс с целью оказать влияние на сохранность посевных качеств семян. Для воздействия на дыхание хранящихся семян нами была выбрана регулируемая газовая среда (РГС) с искусственно заниженным содержанием кислорода.

Методика

Объектом исследования служили семена подсолнечника сорта Передовик улучшенный. Условия гипоксии создавали РГС (азот 98—99%, кислород 1—2%). Подача газовой среды составляла 0,14 л/ч на 1 кг семян. Контролем служили семена, вентилируемые воздухом. Кратковременное хранение (К) влажных семян (W — 13%) — две недели, длительное хранение (Д) сухих семян (W — 6%) — три года. Перед опытами семена стерилизовали 30% H_2O_2 и 96% спиртом, об интенсивности их дыхания судили по поглощению кислорода амперометрическим методом. Для изучения доли участия в дыхании различных окислительных путей использовали ингибиторы фторид натрия и малонат натрия и прямое определение активностей ферментов: глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, глютатионредуктазы и НАДФ·H_2-цитохром-с-редуктазы.

Метод определения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и глютатионредуктазы основан на измерении оптической плотности реакционной смеси при $\lambda = 340$ нм (максимуме поглощения восстановленной формы НАДФ). Об активности НАДФ·H_2-цитохром-с-редуктазы судили по скорости вос-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

становления цитохрома **с** при $\lambda = 550$ нм — максимуме его поглощения. Для предотвращения окисления цитохрома **с** в реакционную смесь вносили KCN.

В предварительно лиофилизированных и обезжиренных гексаном зародышах сухих и начавших прорастать семян (36 ч) определяли содержание свободной и связанной форм β-индолилуксусной кислоты (ИУК). О содержании ИУК судили с помощью биотеста — отрезков колеоптилей пшеницы. Всхожесть семян определяли по ГОСТ 12038—66. Приведенные цифры отражают общие закономерности, наблюдаемые в многократно повторяющихся опытах.

Результаты и обсуждения

В аэробных условиях и при хранении семян в атмосфере азота ингибиторы, подавляющие определенные стадии дыхания, оказывали различное воздействие на поглощение кислорода семенами (табл. 1). Чем выше чувствительность к дей-

Таблица 1

Действие ингибиторов на интенсивность дыхания семян подсолнечника кратковременного хранения

Содержание кислорода, %	Ингибитор	Поглощение кислорода, мк·моль·г$^{-1}$ сырой массы		
		Контроль	+ Ингибитор	% подавления дыхания от контр.
21,0	Натрий	3,6	1,42	70
1,5	Фторид	3,0	1,45	50
21,0	Натрий	3,8	1,45	65
1,5	Малонат	3,2	1,63	50

ствию ингибитора, тем выше доля этого процесса в дыхании. Семена подсолнечника, хранящиеся в обычной газовой среде, оказались более чувствительными к действию фторида натрия, подавляющего один из этапов окисления глюкозы в гликолитическом цикле, и малоната, ингибирующего одно из звеньев цикла Кребса, по сравнению с семенами, находящимися в условиях гипоксии. Это дало нам основание предположить различие в характере окислительного метаболизма семян подсолнечника, помещенных в условия гипоксии, и семян,

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

постоянно находящихся в аэробных условиях. Прямое определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, катализирующей первую реакцию окислительной фазы пентозофосфатного цикла, подтвердило данное предположение (рис. 1). Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы у семян, хранившихся в РГС, была выше, чем у семян, хранившихся на воздухе. При кратковременном хранении разница в активности составляла около 25%, а при длительном достигала 66%. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы при длительном хранении семян в условиях воздуха снижалась более резко, чем при хранении их в условиях гипоксии. По-видимому, ги-

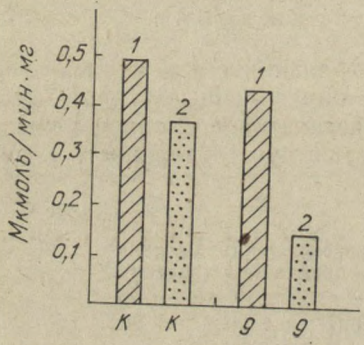


Рис. 1. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в семенах подсолнечника при кратковременном (*к*) и длительном (*д*) их хранении в условиях регулируемой газовой среды (*1*) и воздуха (*2*)

поксия является фактором, активирующим действие глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Сделали вывод, что в семенах в условиях гипоксии реакции апотомии преобладают, в то время как в аэробных условиях доля участия этого пути снижена.

Представляло интерес выявить, на восстановление каких соединений расходуется восстановительный пул НАДФ·H_2, образующийся при функционировании окислительного пентозофосфатного цикла. Согласно литературным данным можно было предположить использование НАДФ·H_2 для восстановления глютатиона при участии фермента глютатионредуктазы, а также на восстановление цитохрома **с** при участии фермента НАДФ·H_2-цитохром-**с**-редуктазы. При этом установлено, что окисление цитохрома **с** связано с системой пероксидирования липидов (рис. 2). В условиях нашего эксперимента глютатионредуктазная активность практически не обнаруживалась. Следовательно, в покоящихся семенах подсолнечника НАДФ·H_2 не расходуется на восстановление глютатиона.

Обнаруженная нами в покоящихся семенах активность

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

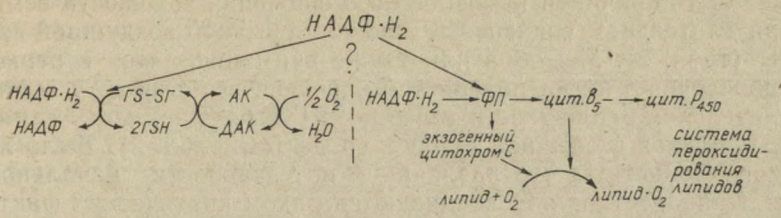


Рис 2. Альтернативные пути использования восстановительного пула НАДФ·H_2 в клетке

НАДФ·H_2-цитохром-**с**-редуктазы указывала на расходование пула НАДФ·H_2 на восстановление цитохрома **с**.

Активность НАДФ·H_2-цитохром-**с**-редуктазы в условиях длительного хранения в РГС практически не отличалась от активности этого фермента при кратковременном пребывании в атмосфере азота (рис. 3). У семян, длительно хранившихся

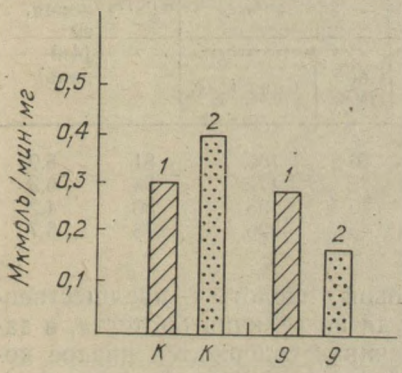


Рис. 3. Активность НАДФ·H_2-цитохром-с-редуктазы в семенах подсолнечника при кратковременном (*к*) и длительном (*д*) их хранении в условиях регулируемой газовой среды (*1*) и воздуха (*2*)

в обычной воздушной среде, активность НАДФ·H_2-цитохром-**с**-редуктазы в два раза ниже, чем у семян кратковременного хранения. При кратковременном хранении семян в аэробных условиях активность НАДФ·H_2-цитохром-**с**-редуктазы была выше, чем в условиях гипоксии, а при длительном хранении наблюдалась обратная зависимость. В аэробных условиях наблюдается дисбаланс: доля участия в общем окислительном метаболизме пентозофосфатного пути снижается, уменьшается пул НАДФ·H_2 при активировании электрон-транспортной цепи с участием НАДФ·H_2 и цитохрома **с**. Это мо-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

жет быть причиной наблюдаемого снижения всхожести семян при длительном хранении в условиях обычной воздушной среды (табл. 2). Мы обратили также внимание, что в период прорастания, когда появляется корешок, его длина у семян, длительно хранящихся в условиях РГС, больше, чем у семян, хранящихся в обычной газовой среде (см. табл. 2). Было логично допустить, что различия в интенсивности начального роста проростков обусловливаются рядом критических факторов, одним из которых является гормон роста β-индолилуксусная кислота (ИУК). Известно, что пентозофосфатный путь

Таблица 2

Посевные качества семян подсолнечника долгосрочного хранения

Содержание кислорода, %	Время хранения семян, г	Ростовая реакция колеоптилей пшеницы (% к контролю) на элюированную с хроматограмм ИУК (эфирные фр. R_f 0,38—0,44)				Всхожесть, %	Средняя длина корня, см (4-й день)
		Зародыши сухих семян		36-часовые проростки			
		Своб. ИУК	Связ. ИУК	Своб. ИУК	Связ. ИУК		
21,0	3	15	25	46	109	81	5,9
1,5	3	36	30	72	172	94	6,3
21,0	8	5	15	25	68	56	4,2
1,5	8	20	25	45	96	78	5,7

является поставщиком шикимовой кислоты — предшественника индольных соединений. Судя по реакции биотеста, в зародышах сухих семян подсолнечника содержится низкое количество свободной и связанной формы ИУК с R_f 0,33—0,44. Причем у семян длительного хранения в РГС прослеживается тенденция к большему содержанию гормона по сравнению с семенами, хранящимися в условиях воздуха (табл. 2). В данной серии опытов для сравнения и установления более четкой закономерности нами были взяты семена восьмилетнего хранения в том же режиме регулируемой газовой среды. У этих семян отмеченная закономерность сохранялась. Большее содержание как свободной, так и связанной форм ИУК, наблюдали у 36-часовых проростков семян, хранившихся в РГС, по сравнению с проростками семян воздушного хранения (см. табл. 2).

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Таким образом, жизнеспособность семян при длительном хранении в РГС выше, чем при хранении в воздушной среде, что свидетельствует о положительном влиянии на них газовой среды с низким содержанием кислорода. Эта среда способствует накоплению восстановительного пула НАДФ·H_2 и гормона роста ауксина, что обусловливается активацией пентозофосфатного цикла.

На основании приведенных и дополнительных исследований были разработаны «Рекомендации по технологии хранения семян подсолнечника в РГС с повышенным содержанием азота», утвержденные Московским технологическим институтом пищевой промышленности и принятые опытно-семеноводческим хозяйством научно-производственного объединения по масличным культурам (г. Краснодар).

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

СХОДСТВО В СВОЙСТВАХ РИБУЛОЗОДИФОСФАТКАРБОКСИЛАЗЫ C_3- И C_4-РАСТЕНИЙ

Е. В. Беляева, М. И. Рыбакова, Н. Г. Доман

Институт биохимии АН СССР

Рибулозодифосфаткарбоксилаза (РДФК), катализирующая первичную ступень в каждом из двух противоположно направленных энергетических процессов — ассимиляции CO_2 и фотодыхании, в значительной степени определяет продуктивность фотосинтеза [1]. По типу фотосинтетического метаболизма углерода различают C_3- и C_4-растения [2]. К последним относятся виды тропического происхождения (кукуруза, сорго, сахарный тростник), которые хорошо адаптируются к условиям жаркого засушливого климата, не имеют видимого фотодыхания и отличаются высокой продуктивностью [3].

Целью нашей работы было сравнительное изучение свойств РДФК из листьев C_4-растения (кукуруза) и C_3-растений (бобы и пшеница озимых сортов различного экологического происхождения и разной продуктивности).

Методика

РДФК выделяли из листьев двух-трехнедельных проростков кукурузы, бобов и пшеницы, выращенных в теплице, а также из флаговых листьев пшеницы с полевых делянок НПО «Подмосковье» в фазу налива зерновки. Очистку фермента проводили фракционированием экстракта из листьев сульфатом аммония с последующим ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы от 5 до 20% [4]. Электрофорез ферментов проводили в 7% полиакриламидном геле (ПАГ) или в градиенте ПАГ от 5 до 15% со щелочным буфером pH 8,9 [5]. Субъединичный состав определяли при электрофорезе в 10% ПАГ с додецилсульфатом натрия [4]. Изоэлектрофокусирование проводили в 5% ПАГ с амфолинами pH 5—7 в течение 5 ч без предварительного электрофореза [6]. Рибулозо-1,5-дифосфат (РДФ) был синтезирован из

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

рибозо-5-фосфата и АТФ с использованием биокатализаторов из листьев бобов [7]. Активность РДФК определяли по включению ^{14}C бикарбоната натрия в присутствии РДФ в кислотоустойчивый продукт [8]. Одновременно определяли карбоксилазную и оксигеназную активность фермента в одной пробе с (U—^{14}C) РДФ [9].

Отношение двух активностей РДФК при насыщении каждой реакции по субстрату существенно не отличалось у растений C_3- и C_4-типа, несмотря на отсутствие видимого фотодыхания у кукурузы [9]. Сообщалось, что в обкладке проводящих пучков листьев C_4-растений, где локализована РДФК, концентрация углекислоты в несколько раз выше, чем в листьях C_3-растений [10]. Мы исследовали зависимость активности РДФК-з от концентрации HCO_3^- при насыщении реакционной смеси кислородом. При низких концентрациях HCO_3 (5—7 мМ) оксигеназная активность ферментов была относительно нечувствительна к углекислоте, но с увеличением концентрации бикарбоната до 30—40 мМ полностью ингибировалась, при этом карбоксилазная активность достигала величины, определяемой при 30 мМ HCO_3^- на воздухе, что подтверждает роль C_4-пути как средства повышения концентрации углекислоты в обкладке проводящих пучков листьев C_4-растений, обеспечивающего независимость ассимиляции CO_2 от концентрации кислорода и высокую продуктивность фотосинтеза.

РДФК из листьев бобов и кукурузы не различаются существенно по молекулярному весу (540000 и 520000 соответственно) и структуре (по два типа субъединиц с мол. весом 55000 и 13000 в ферменте бобов и 52000 и 13000 в ферменте кукурузы) [4], что подтверждается электронной микроскопией [9]. Активность обоих ферментов увеличивается в 2—3 раза при добавлении ионов магния в реакционную смесь до 10—15 мМ. $K_м(Mg^{2+})$ одинакова для обоих ферментов (0,7 мМ) и в основном не зависит от концентрации субстратов (10—40 мМ HCO_3^- и 0,2—0,8 мМ РДФ). Ферменты активны в широком диапазоне pH. РДФК из листьев кукурузы имеет наибольшую активность при pH 7,7, а оптимум pH фермента из листьев бобов находится между 7,9 и 8,1. При низких температурах (0—20°) наблюдается более высокая активность РДФК из листьев бобов по сравнению с РДФК кукурузы как в неочищенных экстрактах из листьев, так и с гомогенными ферментами, однако энергия активации, рассчитанная на линейном участке температурной кривой, прибли-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

зительно одинакова для обоих ферментов — 20—25 кДж/моль. Температурный оптимум активности РДФК бобов и кукурузы находится около 50°, но он изменяется в зависимости от концентрации белка и времени инкубации.

Ферменты, очищенные из листьев пшеницы озимых сортов, не отличаются по электрофоретической подвижности в 7% ПАГ и в градиенте ПАГ 5—15% от РДФК из листьев бобов. Они также не различаются по субъединичному составу (по два типа субъединиц), изоэлектрическим точкам (pH 5,4—5,6), среднему температурному коэффициенту (2,4—2,6). Наибольшие различия наблюдаются по активности и содержанию РДФК в экстракте из листьев. Высокопродуктивные сорта пшеницы южной селекции Питикул и Полукарлик 3 характеризуются высокой активностью фермента в фазу кущения и в фазу налива зерновки [11]. Как показали опыты 1986 г., активность РДФК в значительной степени зависит от физиологического состояния растений. После перезимовки посевы пшеницы сорта Питикул были сильно разрежены, а оставшиеся растения повреждены. В результате активность РДФК в листьях пшеницы этого сорта (0,42 ед/мг белка) была ниже, чем у малопродуктивного, но зимостойкого сорта Ульяновка (0,46 ед/мг белка) и широко распространенного сорта Мироновская 808 (0,53 ед/мг белка).

Таким образом, сравнительное исследование показывает, что РДФК из листьев C_4- и C_3-растений существенно не различаются по своим свойствам, а активность и содержание фермента в листьях, определяемые генотипом, в значительной степени зависят от физиологического состояния растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Andrews T. J., Lorimer G. H. Photorespiration still unavoidable? — FEBS Letters, 1978, v. 90, N 1, p. 1—9.

2. Hatch M. D., Slack C. R. Photosynthetic CO_2-fixation pathways. — Annual Rev. Plant Physiol., 1970, v. 21, p. 141—162.

3. Zelitch I. Improving the efficiency of photosynthesis. — Science, 1975, v. 188, N 4188, p. 626—633.

4. Беляева Е. В., Иванова М. А., Доман Н. Г. Структура и некоторые свойства рибулозодифосфаткарбоксилазы из кукурузы и бобов. — Биохимия, 1979, т. 44, № 12, с. 2121—2129.

5. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. — М.: Наука, 1981. — 288 с.

6. Беляева Е. В., Иванова М. А., Доман Н. Г. Изоэлектрические точки рибулозодифосфаткарбоксилазы / оксигеназы и ее субъединиц из листьев кукурузы и бобов. — Физиол. растений, 1982, т. 29, № 1, с. 173—176.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

7. Беляева Е. В., Терехова И. В., Доман Н. Г. Влияние субстратов на активность рибулозодифосфаткарбоксилазы C_3- и C_4-растений. — Прикл. биохимия и микробиол., 1981, т. 17, № 3, с. 422—429.

8. Беляева Е. В., Терехова И. В., Доман Н. Г. Препаративное получение рибулозо-1,5-дифосфата с биокатализаторами из листьев бобов. — Прикл. биохим. и микробиол., 1982, т. 18, № 3, с. 442—446.

9. Беляева Е. В., Доман Н. Г. Рибулозодифосфаткарбоксилаза-оксигеназа из кукурузы и бобов. — Докл. АН СССР, 1979, т. 245, № 5, с. 1247—1250.

10. Galmiche J. M., Studies of the mechanism of glycerate 3-phosphate synthesis of tomato and maize leaves. — Plant Physiol., 1973, v. 51, N 3, p. 512—519.

11. Чапля С. А., Беляева Е. В., Доман Н. Г., Вареница Е. Т., Рыбакова М. И., Гинс В. К. Рибулозодифосфаткарбоксилаза озимой пшеницы различных сортов. — Тезисы докладов. Междунар. симп. «Фиксация CO_2 и фотосинтетическая продуктивность растений». София, 1984, с. 9.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ВОЗМОЖНАЯ СВЯЗЬ МЕЖДУ ДОЛЕЙ ДЫХАНИЯ В CO_2-ГАЗООБМЕНЕ И ИНДУКЦИЕЙ МЕХАНИЗМА КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ CO_2 У ХЛОРЕЛЛЫ

В. Л. Калер, Л. В. Клокоцкая

Институт экспериментальной ботаники АН БССР

При изучении адаптации фотосинтетического аппарата хлореллы к изменяющимся условиям культивирования в наших экспериментах была отмечена четкая корреляция между долей дыхания в газообмене клеток на свету и способностью их к эффективному использованию в фотосинтезе низких концентраций углекислого газа. Интересно, что в зависимости от условий предынкубации клеток изменялся знак коэффициента корреляции, но его величина в отдельном эксперименте оставалась близкой к 1.

Симбатная корреляция наблюдалась при условиях, нужных для индукции карбоангидразной системы у микроводорослей, показанной в лаборатории В. Е. Семененко [1]. В неиндуцибельных условиях в наших экспериментах наблюдали антибатную корреляцию между долей дыхания в фотосинтетическом газообмене и угловым коэффициентом начального участка углекислотной кривой CO_2-газообмена.

Значения коэффициентов корреляции, близкие к 1, указывают на возможность существования функциональной связи между механизмами индукции карбоангидразной системы и митохондриальным дыханием либо реакциями декарбоксилирования органических кислот.

Опыты проводили с термофильным штаммом Chlorella vulgaris S-39/64688 из коллекции Биологического института ЛГУ им. А. А. Жданова. Суспензию клеток в среде Тамия (pH 6,5) выращивали при освещенности 4 клк и температуре 22 °С; режим освещения — 10 ч света, 14 ч темноты. Суспензию непрерывно продували воздухом, содержащим 1% CO_2. Измерения фотосинтеза и дыхания проводили после 10—12 дней культивирования в таком режиме.

Интенсивность CO_2-газообмена измеряли на оптико-акустическом газоанализаторе ОА-5501 (с регистратором КСП-4)

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

по замкнутой схеме. Начальную концентрацию CO_2 устанавливали прокачкой суспензии хлореллы в среде Тамийя (pH 6,5) воздухом, циркулирующим в контуре с барботером, заполненным буфером Варбурга № 10.

Суспензию клеток помещали в цилиндрический стеклянный ферментер с водяной рубашкой, подключаемой к ультратермостату УТ-15. Ферментер освещался проектором ЛЭТИ через калиброванную ирисовую диафрагму. Интенсивность света измеряли термостолбиком, калиброванным по показаниям измерителя мощности облучения ИМО-2. Суспензия клеток имела оптическую плотность, близкую к 0,1, поэтому поправок на распределение интенсивности света в объеме суспензии не вводили.

Калибровку газоанализатора проводили по буферам Варбурга с последующей линеаризацией калибровочной кривой в форме $n/C = b - an$, где n — показания регистратора КСП-4, мм; C — концентрация CO_2 в воздухе, барботируемом через буфер Варбурга, мкмоль·л$^{-1}$. Коэффициенты этого уравнения были определены при значении коэффициента корреляции $r = -0{,}993$.

Интенсивность газообмена на свету или дыхания в темноте определяли по формуле

$$\Gamma = \frac{\Delta C \cdot V}{\Delta t \cdot N \cdot v},$$

где ΔC — изменение концентрации CO_2, нмоль·мл$^{-1}$; V — объем системы, мл; Δt — интервал времени наблюдения, мин; N — концентрация клеток в исходной суспензии, (млн кл.) × × мл$^{-1}$; v — объем добавленной исходной культуры, мл; Г — скорость газообмена CO_2, нмоль (млн кл.)$^{-1}$·мин$^{-1}$.

Концентрацию клеток измеряли под микроскопом МБИ-3 в камере Горяева.

Регистрируемые на КСП-4 кривые CO_2-газообмена подвергали автоматической коррекции на нелинейность шкалы газоанализатора и обрабатывали на микро-ЭВМ МК-64. Скорость газообмена определяли как тангенс угла наклона корректированных кривых. Газообмен CO_2 культуры в затемненном ферментере принимали как темновое дыхание (Д), на свету — как видимый фотосинтез (Ф). Полный фотосинтез принимали равным сумме видимого фотосинтеза и дыхания (Ф+Д).

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

По результатам определения компонентов газообмена рассчитывали безразмерный коэффициент, отражающий долю темнового дыхания в полном фотосинтезе

$$К_д = \frac{Д}{Ф + Д},$$

и коэффициент, отражающий эффективность использования малых концентраций CO_2 на фотосинтез, который определяли как тангенс угла наклона начального участка углекислотной кривой

$$К_э = \frac{Ф + Д}{С} \text{ (мл.} \cdot \text{(млн кл.)}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}),$$

где С — концентрация CO_2 в газовой смеси (нмоль·мл$^{-1}$) в точке начала измерения Д.

Для выявления влияния изменений температуры и интенсивности света на $К_д$ и $К_э$ проводили отдельные эксперименты. При этом обнаружилась тесная корреляция между этими коэффициентами в единичном эксперименте. Во всех экспериментах использовали культуру, адаптированную к высоким концентрациям CO_2 (1%). Измерения Ф проводили в первом опыте при максимальной освещенности 160 кэрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$ после прокачки суспензии в этих условиях воздухом, содержащим 1% CO_2 в темноте 1,5 ч. При увеличении температуры суспензии от 20 до 37 °С было получено уравнение регрессии

$$К_д = 4{,}39\ К_э + 0{,}0124 \text{ при } r = 0{,}915.$$

Во втором эксперименте такую же суспензию барботировали 1,5 ч в темноте, опыт проводили при температуре 37 °С, варьировали освещенность от 160 до 35 кэрг·см$^{-2}$·с$^{-1}$. Уравнение регрессии в этом случае выявило антибатную корреляцию

$$К_д = -2{,}03\ К_э + 0{,}324 \text{ при } r = -0{,}903.$$

В третьем эксперименте, когда прокачка проводилась сначала в темноте, а затем на свету при 20 °С и варьировании освещенности в тех же пределах, корреляция оказалась симбатной

$$К_д = 3{,}21\ К_э + 0{,}120 \text{ при } r = 0{,}893.$$

Полученные результаты могут указывать на возможную связь дыхания с индукцией механизмов концентрирования CO_2 в клетках микроводорослей.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Условия длительного выращивания суспензии хлореллы соответствовали таким, когда механизмы концентрирования CO_2 не индуцируются (повышенная концентрация CO_2 и невысокая температура, 22 °С). Прокачка клеток на свету в течение 1,5 ч (первый опыт) при повышении температуры от 20 до 37 °С приводила к понижению в замкнутой системе в ходе фотосинтеза стационарной концентрации CO_2, что должно вызывать индукцию механизмов ее концентрирования. В этом случае увеличение эффективности использования низких концентраций CO_2 возрастает, и это возрастание сопровождается увеличением доли дыхания в CO_2-газообмене клеток хлореллы.

Если прокачка проводилась в темноте (второй эксперимент), стационарная концентрация CO_2 в среде поддерживалась на высоком уровне, и механизмы концентрации CO_2 не индуцировались. В этом случае эффективность использования низких концентраций CO_2 возрастает только в случае, когда по каким-либо причинам уменьшается доля темнового дыхания в газообмене (например, при увеличении освещенности клеток). В результате $K_э$ должен коррелировать с $K_д$ антибатно.

В третьем эксперименте условия были промежуточными, изменяясь от неиндуцибельных к индуцибельным по отношению к механизмам концентрирования CO_2. В этом случае (рис. 1) связь между $K_д$ и $K_э$ занимает промежуточное положение (отметим, что корреляция в случае совместной оценки по многим экспериментам отсутствует):

$$K_д = 0{,}201 + 0{,}229; \; r = 0{,}108.$$

Биохимическая основа такой связи может, по-видимому, заключаться в том, что индукция механизмов концентрирования CO_2 в клетке сводится к синтезу карбоангидразной системы [1]. Синтез белка требует повышенного потребления АТФ, что должно уменьшить отношение АТФ/(АТФ+АДФ). В результате должно интенсифицироваться митохондриальное дыхание. В свою очередь, индуцирование механизмов концентрирования CO_2 карбоангидразной системой способствует увеличению эффективности использования низких концентраций CO_2 в фотосинтезе. Такое объяснение не претендует на нечто большее, чем рабочая гипотеза, и возможная связь между дыханием и индукцией механизмов концентрирования нуждается в более серьезном изучении.

В литературе имеются сведения, что индукция механизмов

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

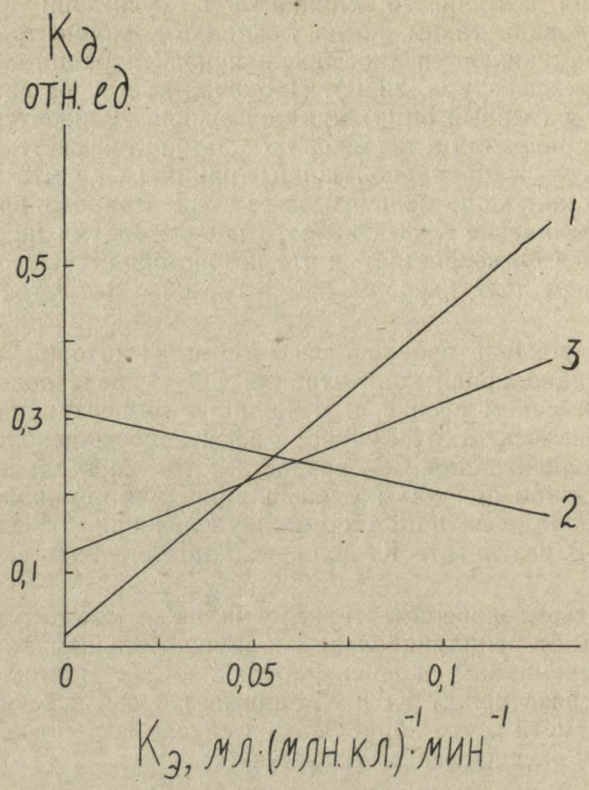


Рис. 1. Корреляционные графики для связи между долей дыхания в CO_2-газообмене суспензии хлореллы ($K_д$) и эффективностью использования малых концентраций CO_2 в фотосинтезе ($K_э$). Условия экспериментов: *1* — индуцибельные для карбоангидразной системы; *2* — неиндуцибельные; *3* — переход от неиндуцибельных к индуцибельным

концентрирования CO_2 в клетках микроводорослей сопровождается падением интенсивности фотосинтеза при высоких концентрациях CO_2, но не за счет увеличения интенсивности дыхания [2, 3]. Это может указывать на сложный характер взаимодействия фотосинтеза и дыхания, однако индукция механизмов концентрирования CO_2 у микроводорослей может накладывать на такое взаимодействие свои особенности.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ЛИТЕРАТУРА

1. Пронина Н. А., Аврамова С., Георгиев Д., Семененко В. Е. Динамика карбоангидразной активности Chlorella и Scenedesmus при адаптации клеток к свету высокой интенсивности и к низкой концентрации CO_2. — Физиол. растений, 1981, т. 28, с. 43.

2. Hogetsu D., Miyachi S. Role of carbonic anhydrase in photosynthetic CO_2-fixation in Chlorella. — Plant Cell Physiol., 1979, v. 20, p. 747.

3. Berry J., Boynton J., Kaplan A., Badger M. Growth and Photosynthesis of Chlamydomonas reinhardii as a function of CO_2 Concentration. — Carnegie Inst. Wash. Year Book, 1976, v. 76, p. 423.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

О РЕАКЦИИ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ НАДФ ХЛОРОПЛАСТАМИ ПШЕНИЦЫ В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ ОСВЕЩЕНИЯ

Т. А. Зайцева, Т. Е. Шапиро, К. А. Луговцова, К. Г. Врублевская

Научно-исследовательский институт биологии и биофизики при Томском университете

Адаптация растений к интенсивности и спектральному составу света происходит благодаря различным приспособительным изменениям, в том числе касающимся структуры фотосинтетического аппарата и его функционирования. В связи с этим изучение развития функциональной активности ЭТЦ фотосинтеза имеет значение в исследованиях оптимизации фотосинтетической деятельности растений. В задачу настоящего исследования входило изучение влияния синего, зеленого и красного света на активность реакции фотовосстановления НАДФ изолированными хлоропластами на ранних стадиях зеленения этиолированных проростков пшеницы.

Методика

Проростки пшеницы (Triticum vulgare L.) сорта Скала выращивали в течение 5 дней в темноте, затем освещали светом различного спектрального состава. Интенсивность падающего света разных участков спектра выравнена по количе-

Активность фотовосстановления НАДФ изолированными пшеницы на свету различного

Свет	4 ч				8 ч	
	E_0		$E_{АДФ}$		E_0	
	$\frac{мкМ\ НАДФН_2}{мг\ хл \cdot ч}$	%	$\frac{мкМ\ НАДФН_2}{мг\ хл \cdot ч}$	%	$\frac{мкМ\ НАДФН_2}{мг\ хл \cdot ч}$	%
Синий	10,59	100	19,71	100	24,18	100
Красный	15,04	142	19,58	99	25,26	104
Зеленый	11,49	108	18,49	94	22,43	94
Белый	12,36	116	21,27	108	22,04	92

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ству поглощенных квантов ($\sim 0{,}97 \cdot 10^{15}$ квант/см^2·с). Хлоропласты выделяли по методу Веста и Вискича [1], концентрацию хлорофилла определяли по Арнону [2], фотовосстановление НАДФ измеряли фотометрически при $\lambda = 340$ нм в суспензии изолированных хлоропластов. Реакционная среда объемом 3 мл содержала: трис — HCl буфер (pH 7,8) — 60, $MgCl_2$ — 5, K_2HPO_4 — 10, АДФ — 10, НАДФ — 2 мкмоль; ферредоксин ~35, хлорофилл — 20—25 мкг. Скорость восстановления НАДФ рассчитывали с использованием коэффициента молярной экстинкции 0,1628. Ферредоксин выделяли из листьев гороха по методу [3], концентрацию его в препаратах определяли с помощью коэффициента экстинкции 0,732 мг/мл$^{-1}$/см$^{-1}$ при 420 нм. В реакциях использовали ферредоксин с отношением плотностей $\lambda_{420}/\lambda_{278}$ не ниже 0,3. Опыты проводили 3—5 раз в 2—3-кратной биологической повторности.

Результаты и обсуждение

При освещении этиолированных проростков пшеницы светом разного спектрального состава наблюдали различия в способности изолированных хлоропластов к фотовосстановлению НАДФ на ранних стадиях формирования фотосинтетического аппарата растений (таблица). Скорость нециклического транспорта электронов, о которой судили по светозависимому восстановлению НАДФ в отсутствие искусственных доноров и акцепторов электрона, позволяет характеризовать совместную работу двух фотосистем от участка разложения воды до образования стабильного восстановленного продукта. Результаты, приведенные в таблице, свидетельствуют, что по данному показателю (E_o) хлоропласты, выделенные из растений, ко-

хлоропластами при зеленении этиолированных проростков спектрального состава

8 ч		12 ч			
$E_{АДФ}$		E_o		$E_{АДФ}$	
$\frac{мкМ\ НАДФН_2}{мг\ хл \cdot ч}$	%	$\frac{мкМ\ НАДФН_2}{мг\ хл \cdot ч}$	%	$\frac{мкМ\ НАДФН_2}{мг\ хл \cdot ч}$	%
56,34	100	42,27	100	97,01	100
43,01	76	33,53	79	61,69	64
42,46	75	37,13	88	74,63	77
48,61	86	38,32	91	82,38	89

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

торые освещали 4 ч синим, зеленым и белым светом, почти не отличались, тогда как на красном свету активность реакций переноса электронов от воды к НАДФ на 42% выше, чем в других вариантах.

Известно, что величина скорости переноса по ЭТЦ при добавлении фосфатакцепторной системы позволяет оценить долю возможного электронного транспорта, энергия которой может быть трансформирована в макроэрги [4]. С целью определения потенциальной энергетической эффективности ЭТЦ в реакционную смесь добавляли АДФ и неорганический фосфат. В этом случае отмечали увеличение скорости фотовосстановления НАДФ хлоропластами при действии любого участка спектра, причем эффект ускорения транспорта электронов $(E_{АДФ} - E_0)/E_0$ больше проявляется при действии синего и зеленого света.

Из результатов опытов по более длительному освещению растений в течение 8 ч светом разного спектрального состава следует, что скорость транспорта электронов от воды в отсутствие фосфатакцепторной системы (E_0) почти одинакова у хлоропластов разных вариантов. При 12-часовом освещении преимущество по данному показателю достоверно выявлено у «синих» хлоропластов по сравнению с «красными». В растениях с зеленого и белого света величина E_0 имеет средние значения.

Присутствие в реакционной среде АДФ и неорганического фосфата приводит к более существенной разнице ($E_{АДФ}$) по вариантам опыта. Так, уже через 8 ч зеленения этиолированных проростков на свету обнаруживается преимущество синих лучей. Следует отметить, что степень ускорения электронного транспорта при этом на зеленом свету не уступает значению этого показателя на красном. При формировании фотосинтетического аппарата в течение 12 ч на свету разного качества имеет место не только относительное, но и абсолютное увеличение значений $E_{АДФ}$ на зеленом свету в сравнении с красным. На синем свету этот показатель остается самым высоким. Скорость реакции фотовосстановления НАДФ по всей ЭТЦ на интегральном белом свету имеет близкое значение с показателем на синем свету, вероятно, потому что лампы ЛДЦ, которыми освещались растения, содержат в спектре излучения большой процент синих лучей [5]. Используя величину ускорения электронного потока фосфатакцепторной системой в качестве показателя фосфорилирующей активности хлоро-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University,
http://vital.lib.tsu.ru

пластов, можно заключить, что энергетическая эффективность фотосинтетических процессов имеет специфику в зависимости от длины волны действующего на растения света.

ЛИТЕРАТУРА

1. West R. H., Wiskich J. T. Photosynthetic control by isolated Pea chloroplasts. — Biochem. J., 1968, v. 109, p. 527.

2. Arnon D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. — Plant Physiol., 1949, v. 24, p. 241.

3. Мухин Е. Н., Акулова Е. А., Гинс В. К. Препаративное получение белков — компонентов фотосинтетической электрон-транспортной цепи. — В кн.: Методы выделения и исследования белков-компонентов фотосинтетического аппарата. Пущино-на-Оке, 1973, с. 20.

4. Безуглов В. К. Влияние внешних условий на первичные процессы транспорта электронов в фотосинтезе. — В кн.: Реактивность фотосинтетического аппарата. Казань: Изд-во Каз. ун-та. 1975, с. 102.

5. Клешнин А. Ф. Растение и свет. — М.: Изд-во АН СССР, 1954. — 453 с.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

АКТИВНОСТЬ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИДФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ ПРИ РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ ОСВЕЩЕНИЯ

Р. И. Лещук, Н. М. Фролова, Л. А. Баталова

Научно-исследовательский институт биологии и биофизики при Томском университете

Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа (ГАФДГ) — один из ключевых ферментов процесса фотосинтеза и дыхания. Известно, что хлоропластная ГАФДГ высших и низших растений использует в качестве кофактора как $НАДН_2$, так и $НАДФН_2$ [1]. Высокая активность НАД(НАДФ)-зависимой дегидрогеназы с обоими коферментами отмечена, например, у хлореллы [2]. В растительной клетке находится также НАД-зависимая ГАФДГ, локализованная в цитоплазме. В отличие от хлоропластного этот фермент способен осуществлять реакцию в обоих направлениях, используя только НАД [3]. Влияние световых условий выращивания на активность дегидрогеназы фосфоглицеринового альдегида в растениях изучено недостаточно.

Мы исследовали влияние разных условий естественного освещения на активность глицеральдегидфосфатдегидрогеназы в листьях овса и гороха в процессе роста растений.

Методика

Растения овса (Avena sativa L.) и гороха посевного (Pisum sativum L.) выращивали при естественном освещении и в затенении. Затенение достигалось с помощью полога, под которым интенсивность света уменьшалась на 1/3 от естественного и полностью сохранялся спектральный состав света [4]. В опытах использовали сформированные листья 7-, 14-, 21-дневных растений, которые растирали на холоде со средой выделения [приведенной Юзбековым] [5]. Ферментативную активность восстановленных форм НАД- и НАДФ-ГАФДГ (КФ 1.2.12 и КФ 1.2.13) в присутствии АТФ и эндогенной киназы определяли спектрофотометрически при 340 нм и рас-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

считывали на 1 мг белка, который определяли по Лоури. Пигменты определяли спектрофотометрически [6].

Результаты и обсуждение

В 7-дневных проростках овса и гороха, выращенных в естественных условиях и при затенении, активности $НАДН_2$- и $НАДФН_2$-ГАФДГ близки и достоверно не отличаются (рис. 1, 2). В 14-дневных растениях увеличивается активность $НАДН_2$- и $НАДФН_2$-специфичных ГАДФГ. У растений, находящихся в условиях естественного освещения, она меньше, чем в затененных. В 21-дневных растениях, выращенных при естественном освещении и затенении, активность двух форм ГАФДГ существенно не изменяется по сравнению с 14-днев-

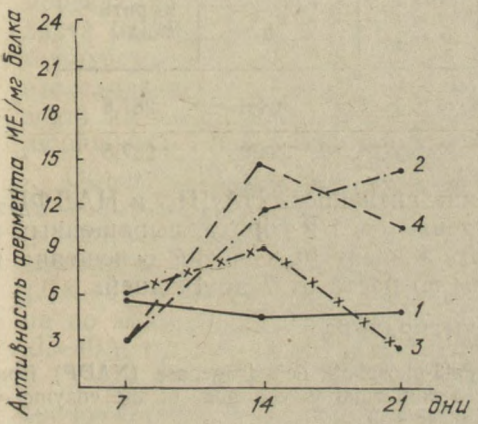


Рис. 1. Активность глицеральдегидфосфатдегидрогеназы в листьях овса, выращенных на естественном свету: $НАДН_2$-ГАФДГ (*1*) и $НАДФН_2$-ГАФДГ (*2*); при затенении: $НАДН_2$-ГАФДГ (*3*) и $НАДФН_2$-ГАФДГ (*4*)

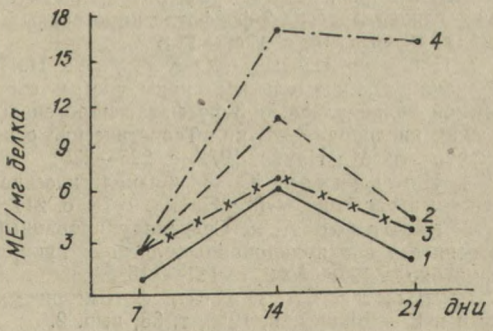


Рис. 2. Активность глицеральдегидфосфатдегидрогеназы в листьях гороха, выращенных на естественном свету: $НАДН_2$-ГАФДГ (*1*) и $НАДФН_2$-ГАФДГ (*2*), при затенении: $НАДН_2$-ГАФДГ (*3*) и $НАДФН_2$-ГАФДГ (*4*)

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ными. В листьях 21-дневных растений овса при естественном освещении активность восстановленных форм ГАФДГ возрастает в сравнении с затененными.

В листьях гороха такого же возраста при затенении активность обеих форм фермента увеличивается. Полученные данные по активации обеих форм дегидрогеназы в 14-дневных листьях овса коррелируют с содержанием хлорофиллов **a** и **b** (табл. 1). В затененных растениях овса содержание хлорофиллов больше, чем на солнечном свету. Количество каратиноидов заметно не изменяется.

Содержание пигментов в 14-дневных листьях овса, выращенного в разных световых режимах, мг/г массы свежих листьев

Условия опыта	Хлорофилл		Каротиноиды
	a	b	
Затененные	838,3	404,5	267,8
Естественное освещение	746,5	334,8	257,5

Таким образом, величина активности $НАДН_2$- и $НАДФН_2$-зависимых ГАФДГ у растений овса и гороха, выращенных в разных световых режимах, зависит от условий освещения и повышается с увеличением возраста от 7 до 14 дней.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cerff R. Gyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP) from Sinapis alba L. NAD(P)-Induced conformation changes of the enzyme. — Eur. J. Biochem. 1978, 82, N 1, p. 45—53.

2. Крыстева Н. Г., Георгиева М. А., Томова Н. Г. Очистка, молекулярный вес и субъединичная структура НАД (НАДФ) зависимой глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы у хлореллы. — Биохимия, 1981, т. 46, вып. 10, с. 1740—1747.

3. Циглер И., Шмидт-Клаузен Н. Д., Б. де Боклер. Ингибирование дополнительным синим светом световой активации НАДФ-зависимой глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и фотосинтетического выделения кислорода. — В кн.: Теоретические основы фотосинтетической продуктивности. М.: Наука, 1972, с. 225—230.

4. Цельникер Ю. Л. Физиологические основы теневыносливости древесных растений. — М.: Наука, 1978. с. 211.

5. Юзбеков А. К. Светоиндуцированный синтез ферментов C_4-пути фотосинтеза в этиолированных листьях кукурузы. — Вестн./Ленингр. ун-т. Серия биол., 1978, № 3, с. 111—115.

6. Шлык А. А. О спектрофотометрическом определении хлорофиллов a и b. — Биохимия, 1968, т. 33, вып. 2.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ФОТОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ХЛОРОПЛАСТОВ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ, ВЫРАЩЕННЫХ НА КРАСНОМ И ЗЕЛЕНОМ СВЕТУ

В. М. Постовалова

Научно-исследовательский институт биологии и биофизики
при Томском университете

Свет регулирует жизнедеятельность растений через изменение метаболизма, фотосинтетической функции и процессов морфогенеза листа. Адаптационные возможности в онтогенезе листа растений при длительном выращивании их в условиях монохроматического света показаны мало. В задачу данных исследований входило изучение влияния красного и зеленого света на становление фотосинтетической активности ассимиляционного аппарата.

Объектом исследования служили овес Avena sativa L. сорта Золотой дождь, кукуруза Zea mays L. сорта Буковинская и серпуха венценосная Serratula coronata L. Растения выращивали в лабораторных условиях в камерах под красным (ЛК-40) и зеленым (ЛЗ-40) лампами. Облученность выравнена по количеству падающих квантов ($2{,}4 \cdot 10^4$ эрг/см^2·с для ЛЗ-40 и $1{,}9 \cdot 10^4$ эрг/см^2·с для ЛК-40).

Хлоропласты выделяли методом дифференциального центрифугирования [1]. О фотохимической активности хлоропластов судили по реакции Хилла и сопряженного с ней нециклического фотофосфорилирования по Заботину [2]. При определении фотохимической активности хлоропласты экспонировали на том же спектральном свету, к которому были адаптированы растения. Красный и зеленый свет выделяли с помощью стеклянных светофильтров КС-13, СЗС-10 и ЖС-17 соответственно. Измерения проводили в аэробной среде при насыщающих для реакции Хилла интенсивностях света. Хлорофилл в суспензии хлоропластов определяли по Арнону [3]. Результаты анализа обработаны статистически [4].

О состоянии фотосинтетического аппарата овса в онтогенезе первого листа судили по фотохимической активности хлоропластов (ФАХ). На рис. 1 показаны возрастные изме-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

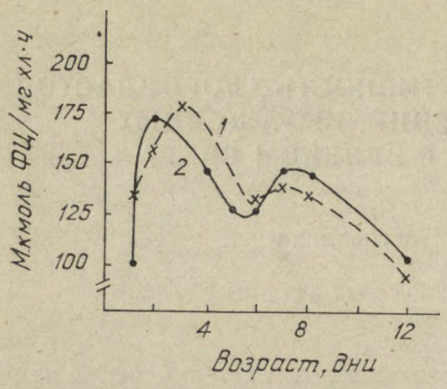


Рис. 1. Изменение скорости реакции Хилла в хлоропластах овса в процессе роста на красном (*1*) и зеленом (*2*) свету

нения фотохимической активности хлоропластов (реакция Хилла), изолированных из первого листа овса. Изменения ФАХ в онтогенезе описываются двумя максимумами. Наибольшая активность реакции Хилла показана для «зеленых» хлоропластов 2-дневных проростков и «красных» хлоропластов 3-дневных проростков, что коррелирует с отставанием в росте первого листа на красном свету [5]. Основной максимум ФАХ предшествует последующему максимуму увеличения длины и площади листовой пластинки [5]. Подобная закономерность обсуждаемых показателей выявлена в онтогенезе пшеницы, выращиваемой в естественных условиях [6]. Второй пик с меньшей величиной ФАХ регистрируется на 7-е сутки. Именно в этом возрасте (судя по площади, длине листовой пластинки и сухому весу) ростовые процессы резко замедляются [5]. В опытах с кукурузой скорость реакции Хилла и нециклического фотофосфорилирования изменяется в зависимости от возраста листа. Наиболее активны хлоропласты в развивающемся листе в возрасте 3 суток с падением активности к 14 суткам в 2 раза (табл. 1). Аналогичные результаты отмечаются для других культур [7].

Такая закономерность наблюдается для растений, выращенных как на красном, так и на зеленом свету. Уровень фотохимической активности «красных» хлоропластов во все стадии онтогенеза листа кукурузы выше, чем «зеленых».

Оценивая влияние спектрального состава света на ФАХ из листьев серпухи, выращенной на красном и зеленом свету, достоверно установлено (табл. 2), что хлоропласты молодого листа имеют более высокую активность по сравнению со

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Таблица 1

Фотохимическая активность хлоропластов, выделенных из проростков кукурузы, выращенной на красном и зеленом свету

Возраст, сутки	Свет	Реакция Хилла, мкмоль Фц/мг хл·ч		Нециклическое фотофосфорилирование, мкмоль АТФ/мг хл·ч	
		На спектральном свету	На белом свету	На спектральном свету	На белом свету
3	Зеленый	148	90	108	60
	Красный	393	46	322	355
5	Зеленый	72	72	23	31
	Красный	172	134	120	80
9	Зеленый	86	84	39	50
	Красный	107	106	60	69
14	Зеленый	62	64	10	10
	Красный	82	71	22	16

Таблица 2

Фотохимическая активность хлоропластов, выделенных из листьев серпухи, выращенной на красном и зеленом свету

Свет	Возраст листа	Реакция Хилла, мкмоль Фц/мг хл·ч		Нециклическое фотофосфорилирование, мкмоль АТФ/мг хл·ч	
		На спектр. свету	На белом свету	На спектр. свету	На белом свету
Красный	Молодой	142±4	168±6	103±0,3	125±3
	Взрослый	78±3	96±1	36±5	49±5
Зеленый	Молодой	104±5	102±4	59±4	57±3
	Взрослый	92±3	115±2	41±6	57±1

взрослыми, особенно на красном свету. На коротковолновом участке отмечена тенденция к повышению активности хлоропластов в молодом листе [8]. Потенциальные возможности «молодых» хлоропластов на красном свету выше, чем «взрослых».

Таким образом, фотохимическая активность хлоропластов определяется спектральным составом света, а также возрастом листа у различных растений.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ЛИТЕРАТУРА

1. West K. R., Wiskich I. T. Photosynthetic control by isolated pea chloroplasts. — Buochem. J., 1968, v. 109, p. 527.

2. Заботин А. И. Определение фотоиндуцируемых изменений pH при исследовании фотофосфорилирования. — В кн.: Методы исследования фотофосфорилирования. Пущино, 1970, с. 182.

3. Arnon D. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. — Plant. Physiol., 1949, v. 24, p. 1.

4. Ракитский Т. Ф. Биологическая статистика. — Минск: Высшая школа, 1973. — 320 с.

5. Постовалова В. М., Карначук Р. А., Прохорова Е. В. Роль света разного спектрального состава в онтогенезе листа. — Физиология растений, 1984, т. 31, вып. 4, с. 752.

6. Зеленский М. И., Могилева Г. А., Романова Л. В. и др. Соотношение характеристик роста и развития с изменением содержания хлорофилла и фотохимической активности с динамикой листовой поверхности в онтогенезе пшеницы. — Физиология растений, 1981, т. 28, вып. 2. с. 307.

7. Кахнович Л. В. Фотосинтетический аппарат и световой режим. — Минск: Наука и техника, 1980. — 144 с.

8. Малкина И. С. Об изменчивости световых кривых фотосинтеза. — Ботанический журнал, 1966, т. 51, № 10, с. 1516.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

РОСТ И ФОТОСИНТЕЗ ЛИСТА СЕРПУХИ, АДАПТИРОВАННОЙ К СПЕКТРАЛЬНОМУ СОСТАВУ СВЕТА

Р. А. Карначук, И. Ф. Головацкая, Н. Н. Протасова

Томский государственный университет
Институт физиологии растений АН СССР

Две важнейшие функции растения — рост и фотосинтез — находятся в тесных донорно-акцепторных взаимоотношениях и составляют основу продукционного процесса. Их взаимосвязь опосредована светом, который служит источником энергии и регулятором многих процессов жизнедеятельности растительного организма. Свет как фактор внешней среды способствует реализации генетических программ на уровне всего растения и его отдельных органов, особенно листьев, эволюционно приспособившихся поглощать солнечные лучи. Очень часто свет солнца падает на лист будучи профильтрованным, что в значительной степени отражается на его спектральной характеристике и соответственно на скорости и направленности ростовых и фотосинтетических реакций. Поэтому необходимо исследовать эти реакции на листьях растений, длительно выращиваемых на свету разного спектрального состава.

Методика

Одним из перспективных для медицины растений и совершенно не исследованным в физиологическом плане является Serratula coronata L. (серпуха венценосная) — вид, вероятно, непревзойденный в растительном царстве по содержанию фитоэкдистероидов.

Растения выращивали из семян в условиях фитотрона на синем, зеленом, красном и белом свету, выравненном по падающим квантам. Характеристика ламп, условия эксперимента, определение ростовых реакций и интенсивности фотосинтеза описаны в [1]. Полученные данные обработаны статистически.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Результаты и обсуждение

Условия освещения (количество и качество света), к которым растения приспосабливаются, определяют все характеристики фотосинтетических и многих ростовых реакций, если остальные факторы внешней среды не лимитируют жизнедеятельность. При этом наиболее зависимый от света орган — лист — изменяет структуру и функцию как индикатор адаптационных изменений всего растительного организма.

Характерным показателем функциональной активности листа является фотосинтез, расчет которого на единицу площади (или веса) показывает преимущества синего света по сравнению с другими участками спектра, что наблюдается

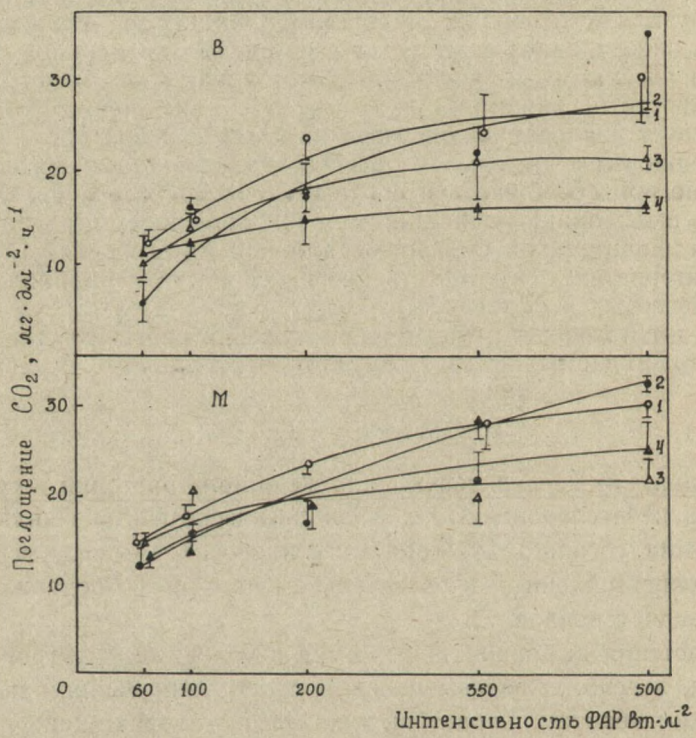


Рис. 1. Световые кривые фотосинтеза молодого (*М*) и взрослого (*В*) листа серпухи венценосной, адаптированной к свету: *1* — белому, *2* — синему, *3* — зеленому, *4* — красному

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

также в наших опытах на серпухе венценосной (рис. 1). В онтогенезе листа этот показатель оставался непревзойденным, что коррелировало с содержанием пигментов в единице площади (рис. 2). Многочисленные работы по синему свету объясняют это явление его регуляторным действием на струк-

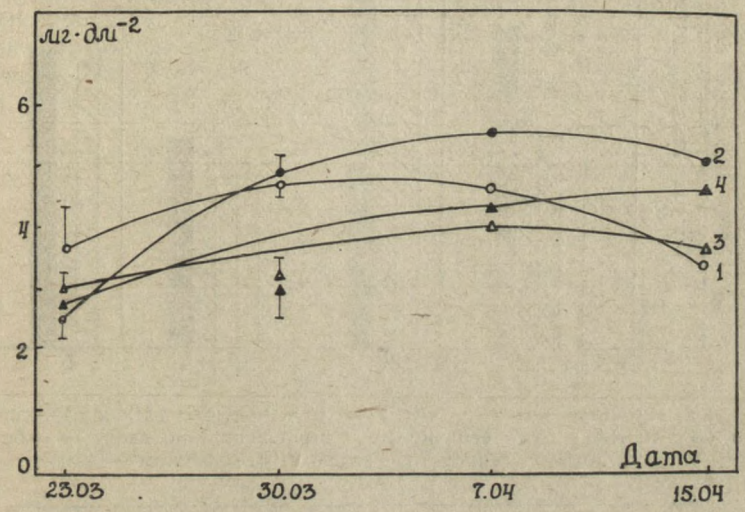


Рис. 2. Содержание хлорофилла a+b в онтогенезе листа серпухи венценосной, адаптированной к свету (обозначения те же, что на рис. 1)

туру хлоропласта. Это теснейшим образом связано с функционированием первичных и вторичных реакций фотосинтеза и с изменением сопротивления устьичной диффузии [2].

Почему же лист, имея такой высокий уровень газообмена CO_2, на синем свету растет медленнее и менее продуктивен по биомассе в сравнении с красным и белым светом (рис. 3)? Общая концепция взаимосвязи фотосинтеза и роста в системе целого растения постулирует определяющую роль морфогенетических процессов в детерминации количественных и качественных характеристик фотосинтеза [3]. Действительно, число клеток в единице поверхности листа растений, сформированных на синем свету, больше, чем в остальных световых вариантах (рис. 4), что характерно и для других видов растений [1]. Этот показатель определяет и концентрацию хлоропластов, которая выше на 49% по сравнению с вариантом

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

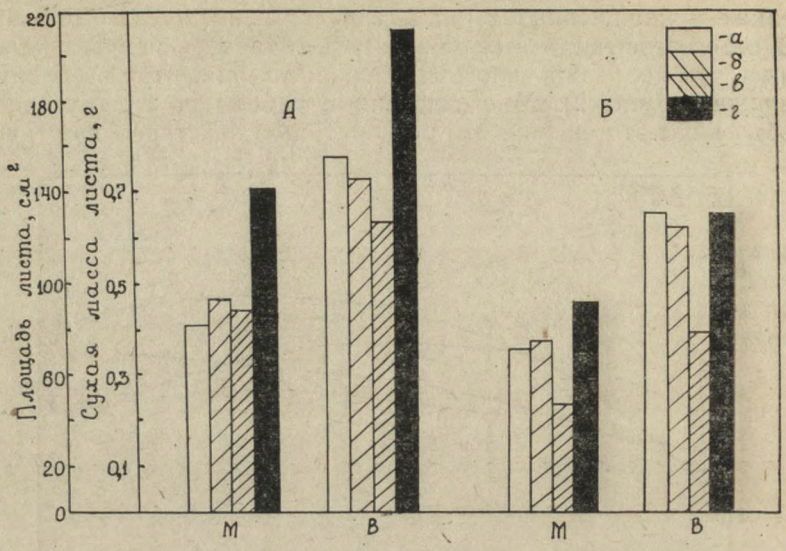


Рис. 3. Площадь (*А*) и сухая масса (*Б*) молодого (*М*) и взрослого (*В*) листа серпухи венценосной, выращенной на свету: *а* — белом, *б* — синем, *в* — зеленом, *г* — красном

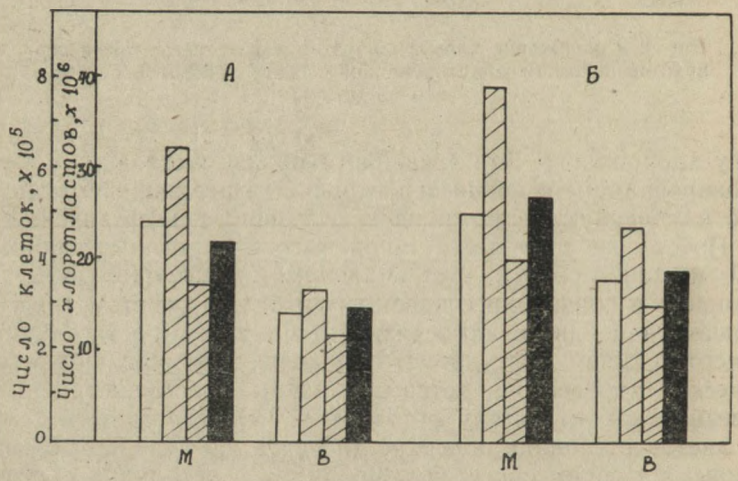


Рис. 4. Общее число клеток (*А*) и хлоропластов (*Б*) в см² молодого (*М*) и взрослого (*В*) листа серпухи венценосной, адаптированной к свету. (Обозначения те же, что на рис. 3)

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

на зеленом свету; на 31% — если растение адаптировано к красному свету и на 36% — к белому. Такое сравнение, сделанное для молодого листа, правомерно и для взрослого. Расчеты по ассимиляции CO_2 на хлоропласт показывают, что активность этой органеллы в варианте на синем свету не превышает таковую для других вариантов. Поэтому уровень фотосинтетического поглощения углекислоты в значительной степени определяется числом хлоропластов на единице поверхности, а не в клетке (таблица), и зависит от скорости деления и растяжения мезофильных клеток.

Число хлоропластов в клетке листа серпухи венценосной, адаптированной к свету

Свет	Возраст листа	Хлоропласты в клетке ткани	
		столбчатой	губчатой
Синий	Молодой	52,0±1,34	84,7±2,20
	Взрослый	67,3±1,98	82,6±2,56
Зеленый	Молодой	45,8±1,16	88,6±3,44
	Взрослый	58,8+1,25	81,3±4,10
Красный	Молодой	51,7±1,44	86,9±3,09
	Взрослый	61,2±1,92	77,0±3,10
Белый	Молодой	43,7±1,05	79,0±2,59
	Взрослый	59,7±1,24	78,6±5,54

Таким образом, свет разных участков спектра регулирует взаимосвязь ростовых и фотосинтетических реакций, меняя их соотношение в онтогенезе листа. Наиболее оптимальным для роста (на примере изученных видов) является красный свет интенсивностью от 60 до 100 Вт/м^2, обеспечивающий формирование листовой пластинки с бо́льшей биомассой и площадью. На зеленом свету образуется тонкий лист с наименьшим весом. Есть данные, что свет этого участка спектра тормозит процессы деления и растяжения клеток [1, 4].

Влияние разных участков спектра возможно через взаимодействие со специальными фоторецепторами в листьях растений. Один из них, фитохром, активируемый красным светом, хорошо изучен. Предполагают, что синий свет воспринимается другим пигментом, природа которого пока не ясна. Менее всего исследована система рецепции зеленого света [4].

В природе под воздействием всех длин волн (в составе

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

солнечного излучения) происходит координированное регулирование всех ростовых реакций, которые в значительной степени определяют и состояние фотосинтетического аппарата растений, имеющего при этом собственную систему контроля, включаемую разными участками спектра. Четкие представления о значении разных участков спектра в реализации морфогенетических программ развития позволят заранее планировать получение урожаев с заданными характеристиками в условиях закрытого грунта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карначук Р. А., Протасова Н. Н., Добровольский М. В. и др. Физиологическая адаптация листа левзеи к спектральному составу света. — Физиология растений. 1986, т. 33. вып. 6, с. 132—143.

2. Воскресенская Н. П. Регуляторная роль синего света в фотосинтезе.— В кн.: Физиология фотосинтеза. М.: Наука, 1982, с. 203—221.

3. Мокроносов А. Т. Интеграция функции роста и фотосинтеза.— В кн.: Рост растений и его регуляция. Кишинев: Штиинца, 1985, с. 183—199.

4. Klein R. M. Reversible effects of green and orange-red radiation on plant cell elongation. — Plant Physiol., 1979, v. 63, p. 114—116.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РОСТА В ОНТОГЕНЕЗЕ ЛИСТА РАСТЕНИЙ НА СВЕТУ

И. Ф. Головацкая, Р. А. Карначук, П. В. Власов

Научно-исследовательский институт биологии и биофизики
при Томском университете
Томский государственный университет
Институт физиологии растений АН СССР

Одним из важных факторов, регулирующих процессы жизнедеятельности растительного организма на протяжении всего его онтогенеза, является свет. Для растений имеет большое значение как интенсивность, так и качественный состав света, при этом ответная реакция зависит от видовых особенностей.

Регуляторное действие света на рост растений проявляется через ряд эндогенных систем: фоторецептор (например, фитохром), геном, фотозависимые фенолы, фитогормоны [1]. Гормональная регуляция занимает важное место в системе контроля как на уровне целого растительного организма, так и на уровне отдельных органов. Наличие растительных гормонов в листе показано многими авторами [2, 3], установившими их важную регуляторную роль в онтогенезе основного ассимилирующего органа растений. Однако мало изучено действие света разного качества на гормональный баланс листа растений, длительно выращиваемых в условиях закрытого грунта, где источником света служат лампы с разными спектральными характеристиками. Однозначно ли меняется уровень гормонов в ответ на действие света разного спектрального состава? Выяснение этого вопроса и составило содержание наших исследований.

Методика

Объектами исследования служили растения Lychnis chalcedonica L. (лихнис кальцедонский) и Rhaponticum carthamoides Iljin (левзея сафлоровидная), длительно выращиваемые в почвенной культуре в условиях фитотрона на синем, зеленом, красном и белом свету. Свет был выравнен по числу падающих квантов с учетом особенности поглощения в средневолновом участке ФАР. Лист изучали в состоянии активного роста (молодой) и закончившего рост (взрослый). Определение гор-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

монов проводили с использованием методик хроматографирования и биотестирования [4, 5].

Результаты и обсуждение

Для многих растений, выращиваемых при одинаковой интенсивности падающего света на разных участках спектра, было показано увеличение длины стебля, междоузлий и листьев от синего к красному [6]. В наших опытах анатомо-морфологические показатели листа также обнаружили зависимость от спектрального состава света. Площадь листа лихниса и левзеи по мере его роста и развития возрастала с увеличением длины волны действующего света. Возможно, это связано с активацией гиббереллинов, количество которых на красном свету значительно больше по сравнению с другими вариантами (рис. 1). В молодых листьях на красном свету была обнаружена наибольшая суммарная активность свободных гиббереллиноподобных веществ (ГПВ): лихнис — 39%, левзея — 28,7%. Один из стимуляторов роста находился в зоне аутентичного пятна метчика $ГА_3$ (R_f = 0,6—0,7). Однако на этом участке хроматограммы могут располагаться и другие активные гиббереллины, например $ГА_1$. При освещении красными лучами наблюдалось усиление второй фазы роста клеток — растяжение. Подавление этих ростовых реакций было отмечено на зеленом свету [7]. Формирование меньшей листовой пластинки на синем и зеленом свету происходило на фоне низкой активности свободных ГПВ в молодых листьях и высокой — во взрослых.

Наши исследования показали особенности действия разных участков ФАР на состояние гормональных веществ ауксиновой природы (рис. 2). Высокая активность свободных ауксинов отмечалась на синем свету. В молодых листьях лихниса и левзеи активность стимуляторов соответствовала действию 10^{-8} и 10^{-7} моль/л ИУК (R_f = 0,3—0,4). С прекращением роста увеличивалось число сопутствующих ауксинам ингибиторов, один из которых по R_f-величине и характеру действия близок к абсцизовой кислоте (R_f = 0,6—0,8). В онтогенезе листа растений, выросших на зеленом и красном свету, активность ауксинов уменьшалась.

Видовая особенность растений в реакции на свет проявилась в абсолютных величинах активности отдельных стимуляторов роста и суммарной активности. У вида с большей лис-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

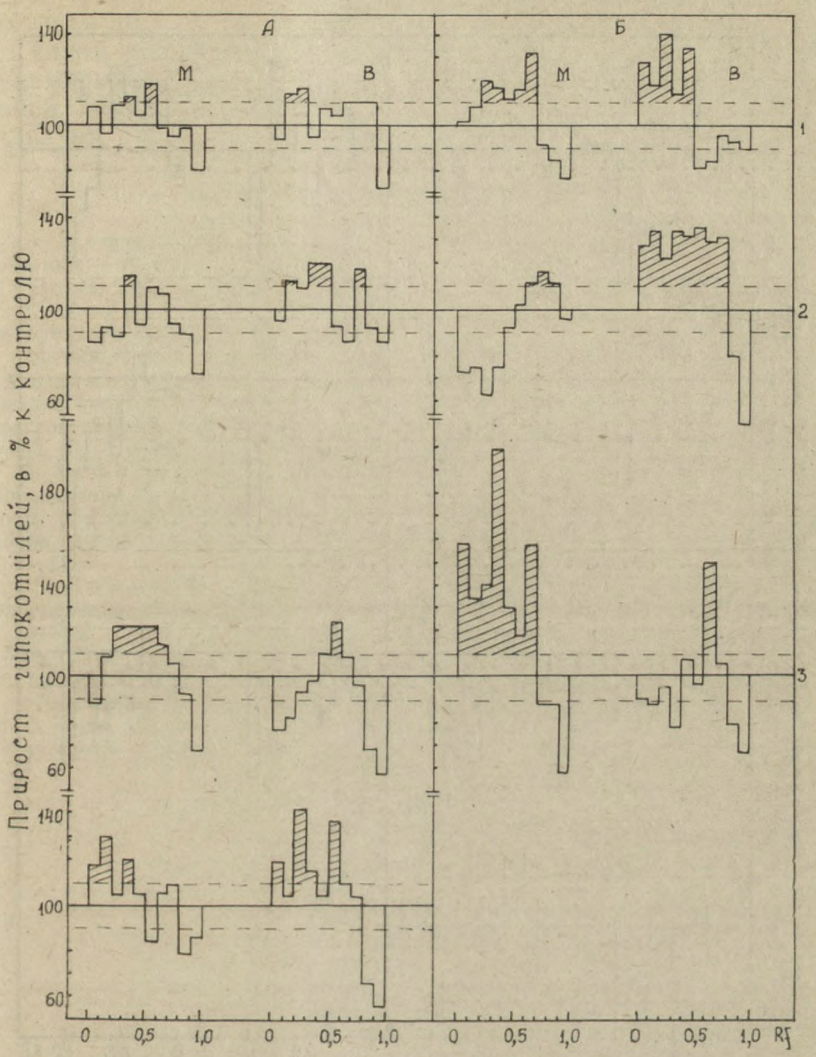


Рис. 1. Изменение активности свободных гиббереллинов в листьях лихниса (*А*) и левзеи сафлоровидной (*Б*), адаптированных к спектральному составу света (*М* — молодой, *В* — взрослый лист): *1* — синий, *2* — зеленый, *3* — красный, *4* — белый свет. Биотест: прирост гипокотилей салата; растворитель — изопропиловый спирт: вода (5 : 2); расчет на 1000 мг сухой массы листа

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

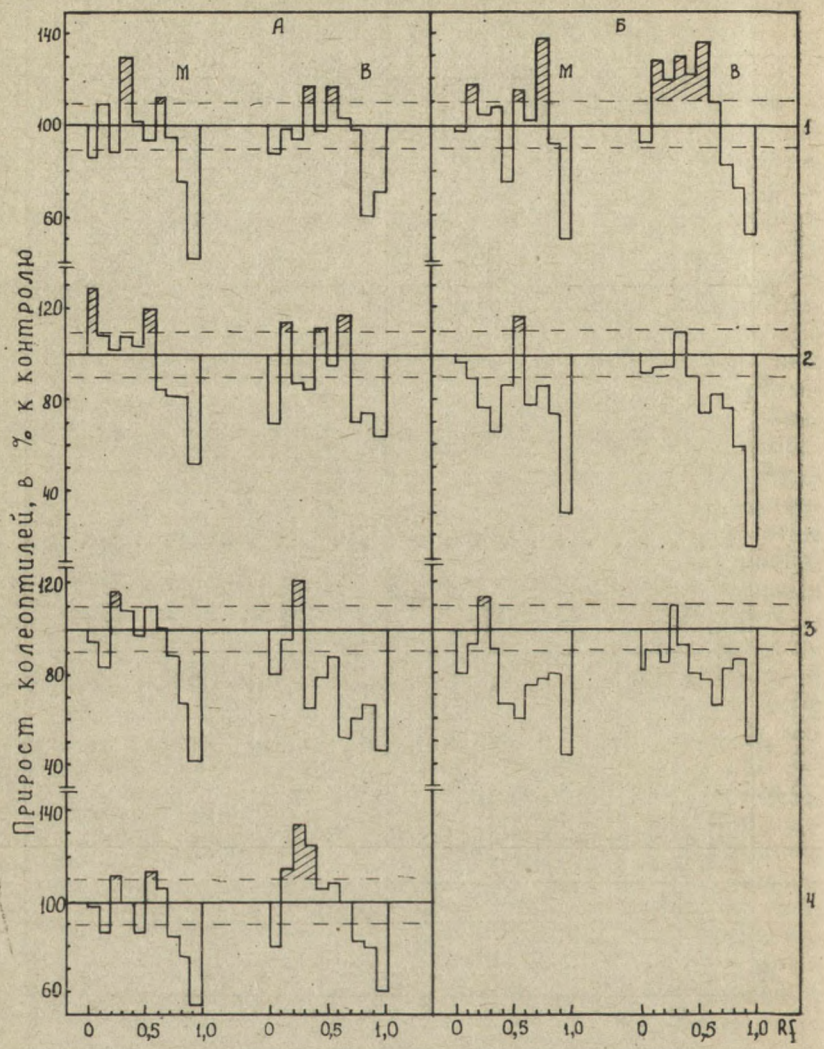


Рис. 2. Изменение активности свободных ауксинов в листьях лихниса (*А*) и левзеи сафлоровидной (*Б*), адаптированных к спектральному составу света (обозначения те же, что на рис. 1). Биотест: прирост отрезков колеоптилей пшеницы; растворитель — изопропиловый спирт:аммиак:вода (10:1:1)

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

товой пластинкой (левзея сафлоровидная) отмечена и наибольшая абсолютная величина активности.

Таким образом, спектральный состав света оказывает регуляторное действие на состояние гормональной системы растений, меняя соотношение стимуляторов и ингибиторов роста, а значит, скорость ростовых процессов в онтогенезе листа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кефели В. И. Действие света на рост и морфогенез высших растений. — В кн.: Фоторегуляция метаболизма и морфогенеза растений. М.: Наука, 1975, с. 209—227.

2. Кефели В. И. Взаимодействие фитогормонов и природных ингибиторов при росте растений. — Физиология растений, 1971, т. 18, вып. 13, с. 614—630.

3. Якушкина Н. И., Дурандин А. И. Влияние спектрального состава света и гиббереллина на темпы роста и гормональный обмен проростков ячменя. — В кн.: Особенности гормональной регуляции роста растений. М.: Наука, 1973, с. 95—104.

4. Кефели В. И., Турецкая Р. Х., Коф Э. М., Власов П. В. Определение биологической активности свободных ауксинов и ингибиторов роста в растительном материале. — В кн.: Методы определения фитогормонов, ингибиторов роста, дефолиантов и гербицидов. М.: Наука, 1973, с. 7—22.

5. Ложникова В. Н., Хлопенкова Л. П., Чайлахян М. Х. Определение природных гиббереллинов в растительных тканях. — Там же, с. 50—58.

6. Vince D. An interpretation of the promoting effect of far red light on the flowering of longday plants. — Photobiol., 1966, v. 5, p. 5—6.

7. Карначук Р. А., Протасова Н. Н., Добровольский М. В. и др. Физиологическая адаптация листа левзеи к спектральному составу света. — Физиология растений, 1986, т. 33, вып. 6, с. 132—143.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЕЛИЧИНЫ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ ЕДИНИЦЫ И ЧИСЛА РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ У МУТАНТОВ CHLAMYDOMONAS С РЕДУКЦИЕЙ СВЕТОСОБИРАЮЩЕГО КОМПЛЕКСА

В. Г. Ладыгин, С. И. Аллахвердиев, А. Г. Четвериков

Институт почвоведения и фотосинтеза АН СССР
Институт физиологии растений АН СССР

Известно, что первичные реакции реакционных центров фотосистемы I (ФС I) и фотосистемы II (ФС II) не являются лимитирующими в процессе фотосинтеза. Поэтому интегральная фотосинтетическая активность хлоропластов на уровне электрон-транспортной цепи определяется числом реакционных центров. Отношение суммы хлорофиллов (a+b) к числу центров ФС I или ФС II (величина фотосинтетической единицы) не является постоянным и определяется редукцией содержания светособирающего комплекса.

Цель настоящей работы состояла в том, чтобы изучить, как изменяется величина фотосинтетической единицы у мутантов, утративших часть или весь светособирающий комплекс. Кроме того, важно было установить, сохраняются ли при этом все реакционные центры или нет, что в конечном счете будет характеризовать фотосинтетическую активность хлоропластов и потенциальную продуктивность растений в оптимальных условиях.

Методика

В качестве объекта использовали клетки дикого типа одноклеточной зеленой водоросли Chlamydomonas reinhardii и мутанты: С-48, без хлорофилла b, утративший часть светособирающего комплекса; СС-107 с потерей всего светособирающего комплекса; ACC-238 без светособирающего комплекса и без фотосистемы I [1]. Все мутанты получены после воздействия γ-излучения ^{137}CS в дозе 200 Гр. Изучение светоиндуцированных изменений поглощения $П_{680}$, феофитина реакционного центра ФС II и $П_{700}$ реакционного центра ФС I проводили на однолучевом дифференциальном спектрофотометре с фосфороскопом [2, 3]. Сигналы ЭПР регистрировали на радиоспектрометре «Рубин» РЭ-1306 при —196° [4].

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Результаты и обсуждение

Потеря любого хлорофилл-белкового комплекса у мутантов сопровождается уменьшением содержания хлорофилла. Так, у мутантов С-48, СС-107 и АСС-238 их количество падает до 68, 41 и 10% соответственно в сравнении с контрольным.

Важно было исследовать, как столь существенные изменения в содержании хлорофиллов сказываются на числе реакционных центров и величине фотосинтетической единицы. Количественная оценка содержания реакционных центров ФС II и ФС I была проведена прямым их измерением. Реакционные центры ФС II анализировали по светоиндуцированному изменению поглощения $П_{680}$ и феофитина, а ФС I — по $П_{700}$, а также по сигналам ЭПР I и ЭПР II. Характерные кривые кинетики фотоиндуцированных изменений поглощения при 685 нм, связанных с фотовосстановлением феофитина (Фео) и при 680 и 700 нм, обусловленных фотоокислением $П_{680}$ и $П_{700}$ и сигналов ЭПР представлены на рис. 1. По величине фотоиндуцированных изменений поглощения $П_{680}$, Фео, $П_{700}$ и сигналов ЭПР были рассчитаны размеры фотосинтетической единицы. Полученные данные показали (табл. 1), что

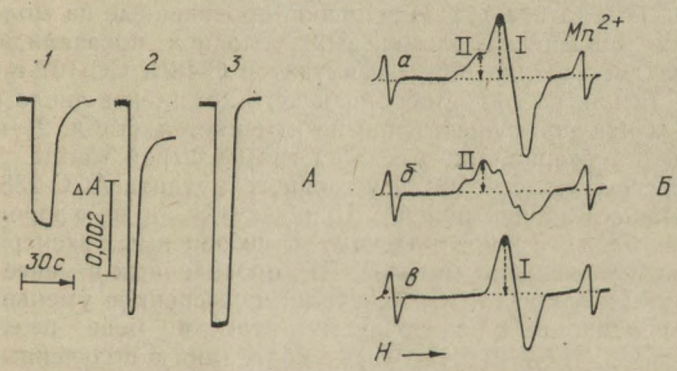


Рис. 1. Кинетика светоиндуцированных изменений поглощения при 23 °С (*А*: *1* — феофитина при 685 нм; *2* — $П_{680}$; *3* — $П_{700}$), а также сигналов ЭПР при —196 °С (*В*: *а* — клетки дикого типа К (+); *б* — мутант А-66 без ФС I; *в* — мутант А-90 без ФС II). Стрелками показана величина сигналов, обусловленная парамагнитными центрами $П_{700}$+ФС I (I) и пластосемихинона ($Пх^-$) ФС II (II). Сигнал Mn^{2+} использовали в качестве стандарта

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

в клетках дикого типа К(+) на один реакционный центр ФС I или ФС II приходится 620—880 молекул хлорофиллов (a+b). Потеря хлорофилла b у мутанта С-48 уменьшает размер фотосинтетической единицы до 300—430 молекул хлорофилла. В отсутствие светособирающего комплекса у мутанта СС-107 размер антенны ФС I и ФС II составляет 150—260 молекул хлорофилла a. Чистый комплекс ФС II мутанта АСС-238 в нативном состоянии может содержать от 30 до 130 молекул хлорофилла, но обычно размер фотосинтетической единицы ФС II мутантов колеблется в пределах 40—60 молекул хлорофилла a.

У штаммов, содержащих обе фотосистемы, соотношение реакционных центров ФС II/ФС I колеблется от 0,6 до 1,4 (см. табл. 1) в зависимости от функционального состояния и стадии онтогенеза. Обычно в функционально активных хлоропластах оно близко к 1,0 или выше. При неблагоприятных условиях или в онтогенетически старых хлоропластах соотношение центров становится меньше единицы, что связано, как правило, с лабильностью ФС II, обусловливающей снижение ее функциональной активности и утратой части реакционных центров [4].

Абсолютная величина числа реакционных центров зависит от вида растения и других факторов и может в значительной степени колебаться [4]. Измерения, проведенные на молодых клетках, выросших в одинаковых условиях, показали, что в клетках дикого типа К(+) и мутантов С-48 и СС-107 с потерей части или всего светособирающего комплекса число реакционных центров существенно не изменяется (табл. 2) как в расчете на хлоропласт, так и на грамм сырой массы. Даже при потере комплекса ФС I у тройного мутанта АСС-238 число реакционных центров ФС II на клетку и на хлоропласт остается близким к контрольному. В независимых экспериментах с использованием метода ЭПР, проведенных в менее благоприятных условиях, мы отмечали постепенное уменьшение числа реакционных центров у мутантов по мере редукции комплексов (табл. 2). Некоторые колебания в полученных результатах могут быть обусловлены либо особенностями двух используемых методов измерения, либо неадекватным состоянием культуры в различных экспериментах.

Результаты анализа числа реакционных центров на 1 мг хлорофилла четко показывают, что по мере редукции светособирающего хлорофилл-a/b-белкового комплекса число реакционных центров возрастает (см. табл. 2). Причем при из-

Таблица 1

Величина фотосинтетической единицы в клетках дикого типа и мутантов Chlamydomonas reinhardii, рассчитанная по светоиндуцированным изменениям поглощения $П_{680}$, феофитина, $П_{700}$ и сигналам ЭПР I и ЭПР II

Штамм	Размер антенны ФС I и ФС II, установленный абсорбционным методом			Размер антенны ФС I и ФС II, определенный методом ЭПР		Отношение РЦ ФС II / РЦ ФС I
	Хл./$П_{680}$	Хл./Фео	Хл./$П_{700}$	Хл./Пх.$^-$	Хл./$П_{700}^+$	
К (+)	875±46	809±73	624±37	860±97	881±44	0,7—1,1
С-48	340±32	300±34	404±41	309±31	432±68	1,2—1,4
СС-107	264±86	158±49	152±34	233±45	223±43	0,6—1,1
АСС-238	51±18	42±12	0	129±34	0	—
АСС-66	48±15	38±16	0	—	—	—
АСС-98	60±14	46±17	0	—	—	—
АСС-100	57±11	48±12	0	95±18	0	—

Примечание. Мутанты АСС-66, АСС-98, АСС-100 и АСС-238 содержат только один хлорофилл-белковый комплекс, включающий в свой состав реакционный центр ФС II.

Digital Library (repository) of Tomsk State University http://vital.lib.tsu.ru

Таблица 2

Число реакционных центров ФС I и ФС II в клетках дикого типа и мутантов, рассчитанное по величине светоиндуцированных изменений поглощения $П_{680}$, феофитина и $П_{700}$, а также сигналов ЭПР парамагнитных центров ФС I ($П_{700}^{+}$) и пластосемихинона ФС II ($Пх.^{-}$)

	Вариант	Число реакционных центров × $\times 10^6$ на клетку или на хлоропласт				Число реакционных центров × $\times 10^{14}$ на 1 г сырой массы				Число реакционных центров × $\times 10^{14}$ на 1 мг хлорофилла			
		К (+)	С-48	СС-107	АСС-238	К (+)	С-48	СС-107	АСС-238	К (+)	С-48	СС-107	АСС-238
ФС II	$П_{680}$	2,47	3,02	2,35	3,09	71,3	105,3	55,2	55,5	7,7	19,8	26,3	132,1
	Фео	2,67	3,42	3,93	3,75	77,1	119,3	92,2	67,4	8,3	22,5	42,7	160,4
	$Пх^{-}$	1,90	1,52	1,45	0,32	55,1	45,3	34,3	6,0	7,5	21,7	31,6	52,2
ФС I	$П_{700}$	3,46	2,54	4,09	0	100,0	88,6	95,8	0	10,7	16,7	44,5	0
	$П_{700}^{+}$	1,92	1,09	1,39	0	55,5	32,5	32,8	0	7,6	15,6	30,1	0

Digital Library (repository) of Tomsk State University http://vital.lib.tsu.ru

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

мерении методом ЭПР оно четко коррелирует с относительным содержанием хлорофилла фотосистем, а измеренная по изменению поглощения для тройного мутанта АСС-238 — несколько превышает. Можно полагать, что оба метода дают близкие к истинным величинам значения числа реакционных центров, но если фосфороскопический метод может их несколько завышать, то метод ЭПР скорее иногда снижает истинное значение.

Аналогичных данных для нативных комплексов в литературе не описано. Но их можно сравнить с последними данными, полученными на выделенных комплексах ФС II. Если принять, что из пяти полипептидов ФС II только два высокомолекулярных 43—47 КД и 47—53 КД включают хлорофилл по 23—25 молекул, то каждый реакционный центр должен содержать 50 молекул хлорофилла [5] и иметь молекулярную массу около 225 КД [6]. Эти данные согласуются с организацией нативных комплексов ФС II у мутантов Chlamydomonas reinhardii, которые содержат 50±10 молекул хлорофилла а на один реакционный центр и обладают функциональными свойствами, характерными для клеток дикого типа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ладыгин В. Г. Спектральные свойства хлорофилл-белкового комплекса фотосистемы II в нативном состоянии. — Физиол. растений, 1985, т. 32, вып. 5, с. 851—859.

2. Fujita I., Davis M. S., Fajer J. Anion radicals of pheophytin and chlorophyll «a»: their role in the primary charge separations of plant photosynthesis. — J. Amer. Chem. Soc., 1978, v. 100, p. 6280—6282.

3. Hiyama T., Ke B. Defference spectra and extintion coefficients of P_{700}. — Biochim. Biophys. Acta, 1972, v. 267, N 1, p. 160—171.

4. Четвериков А. Г. Использование ЭПР-спектроскопии для изучения физиологии фотосинтеза. — Физиол. растений, 1983, т. 30, вып. 4, с. 682—692.

5. Satoh K. Protein-pigments and photosystem II reaction center. — Photochem. Photobiol., 1985, v. 42, N 6, p. 845—853.

6. Takahashi M., Mano J., Asada K. Molecular sizes of the catalytic units of oxygen evolution and the reaction center in photosystem II of spinach thylakoids. — Plant Cell Physiol., 1985, v. 26, p. 383—388.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

СОСТАВ, ОРГАНИЗАЦИЯ И СТРУКТУРНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ХЛОРОФИЛЛ-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ ФОТОСИСТЕМЫ I И ФОТОСИСТЕМЫ II

В. Г. Ладыгин, Г. Н. Ширшикова, Г. А. Семенова

Институт почвоведения и фотосинтеза АН СССР
Институт биологической физики АН СССР

Важность исследования механизма фотосинтеза с целью повышения продуктивности растений не вызывает сомнений как с точки зрения решения проблемы пищевых, так и энергетических ресурсов.

Установление последовательности, биохимического состава и функциональной активности отдельных компонентов в условиях in vivo или приближенных к нативному состоянию можно осуществить с помощью мутантов, используемых в качестве модельных объектов. Это применимо и к изучению ключевых звеньев в механизме фотосинтеза — фотосистемам мембран хлоропластов. До сих пор окончательно не установлено, как из основных компонентов мембран фотосинтетического аппарата (белков, хлорофиллов, липидов и каротиноидов) формируются фотосистема I (ФС I) и фотосистема II (ФС II) зеленых растений, как они пространственно локализованы и функционируют в мембранах тилакоидов?

Методика

В качестве объекта мы избрали одноклеточную зеленую водоросль Chlamydomonas reinhardii, которая имеет один чашеобразный хлоропласт с мембранной системой, близкой по биохимическому составу к таковой хлоропластов высших растений [1—4], что дает основание предполагать аналогичную молекулярную организацию ее мембранной системы с хлоропластами высших растений. Получение и отбор мутантов проводили после воздействия как физических, так и химических мутагенов. Для этих целей мы использовали ультрафиолетовые лучи (от лампы БУВ-30П), гамма-излучение и нитрозоэтилмочевину. Чаще других мы использовали гамма-излучение, и большинство наших мутантов получено после воздей-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ствия гамма-излучения Cs^{137} в дозе 200 Гр при выживаемости 1—2% и выходе видимых мутантов около 10% [5—6].

Результаты и обсуждение

Пигментные мутанты, как правило, обладали активными фотосистемами. Те же из них, которые не росли фототрофно и не имели активности ФС I или ФС II, были отнесены в группу нефотосинтезирующих. Используя в качестве тестов на активность ФС II: а) светоиндуцированное изменение выхода флуоресценции хлорофилла ФС II, б) реакцию Хилла с ДХФИФ, в) послесвечение хлорофилла и г) сигнал II ЭПР с полушириной 19 Гс; а на активность ФС I: а) фотоиндуцированное изменение поглощения $П_{700}$ и б) сигнал I ЭПР с полушириной 7—8 Гс, мы отобрали мутанты с неактивной ФС I [1], с неактивной ФС II [2] и с неактивными обеими фотосистемами [3, 5—7]. Среди пигментных были отобраны мутанты, не содержащие хлорофилла b [3] и с частичной потерей обоих хлорофиллов [4]. Следовательно, было выделено 4 типа мутаций, два из которых нарушали активность ФС I или ФС II, а два — только хлорофилл b и хлорофилл a_{679} светособирающего комплекса.

Возникает вопрос, связаны ли наблюдаемые изменения с утратой специфических белков или нет? Для выяснения этого вопроса мы провели анализ хлорофилл-белковых комплексов и установили (рис. 1), что потеря активности ФС I обусловлена отсутствием у этой группы мутантов хлорофилл-белкового комплекса ФС I (СР I). Потеря активности ФС II обусловлена отсутствием комплекса ФС II (СР II) [8]. В состав светособирающего комплекса (LH), вероятно, входят два комплекса, один из которых включает только хлорофилл a и формирует полосы LH_0 и LH_2, а другой помимо хлорофилла a включает хлорофилл b и обусловливает образование хлорофилл-белка LH_3 и его олигомера LH_1 [8].

Поскольку было обнаружено четыре типа мутаций, ведущих к потере определенных хлорофилл-белков, то возникает вопрос, какие формы хлорофилла связаны с каждым из этих комплексов? В работах Френча, Браун, Крамера, Батлера, Красновского, Литвина и др. было установлено, что в хлоропластах растений существует, по крайней мере, две формы хлорофилла b и 7—8 форм хлорофилла a. Это было подтверждено и в наших исследованиях [3, 4]. Оставался неясным вопрос, как распределены все эти универсальные формы

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

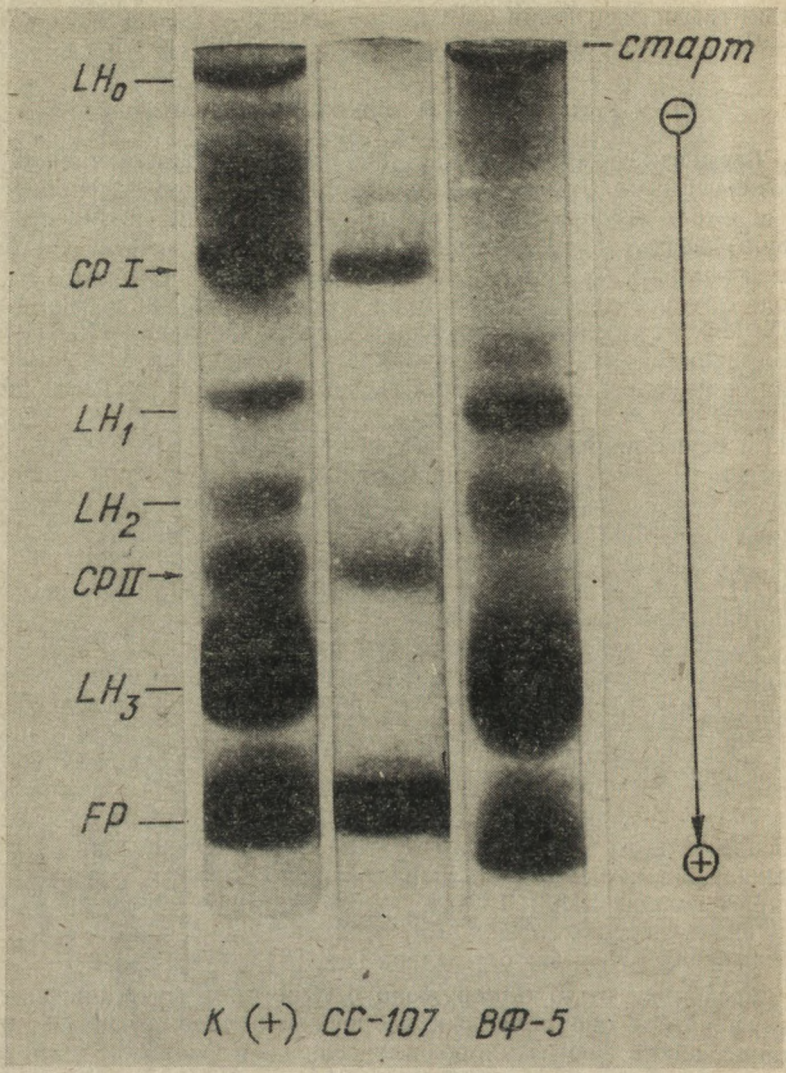


Рис. 1. Гель-электрофорез хлорофилл-белковых комплексов хлоропластов клеток дикого типа К (+) и мутантов СС-107, содержащих только ФС I и ФС II, и ВФ-5, содержащих только светособирающий комплекс. Реакционные центры ФС I и ФС II связаны с комплексами СР I и СР II соответственно

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

хлорофилла между фотосистемами? Ответить на этот вопрос по результатам, полученным в исследованиях на клетках дикого типа, не удавалось. Локальное нарушение одного из белков комплексов и той части хлорофилла, которая с ним связана, позволяло надеяться на выяснение характера распределения форм хлорофилла между ФС I, ФС II и светособирающим комплексом.

Методом низкотемпературной производной спектров поглощения нами было установлено (рис. 2), что потеря хлорофилл-белка ФС I обусловливает потерю наиболее длинноволновых форм хлорофилла **a** с максимумами поглощения при 689, 698 и 703 нм. В то же время потеря хлорофилл-белка ФС II обусловливает потерю только одной полосы поглощения при 685 нм. Эти данные позволяют считать, что указанные формы хлорофилла **a** являются основными компонентами ближайшего окружения реакционных центров ФС I и ФС II соответственно и выполняют функции фокусирующей антенны каждой из фотосистем. Весь хлорофилл **b** и коротковолновые формы хлорофилла **a** с полосами поглощения 667 и 679 нм выполняют функции светособирающих пигментов, передающих энергию возбуждения на антенные формы хлорофилла обеих фотосистем [3]. Одна часть светособирающего комплекса, включающего хлорофилл **b**, связана с ФС II и расположена в гранальных участках мембран хлоропластов. Другая, содержащая только хлорофилл **a**, связана с ФС I и локализована преимущественно в межгранных участках тилакоидов [9].

В электронно-микроскопических исследованиях тонких срезов мутантов с неактивной ФС I было установлено, что в отличие от клеток дикого типа у них сильно редуцированы межгранные участки тилакоидов. Напротив, у мутантов с неактивной ФС II остаются только единичные тилакоиды, не имеющие плотных контактов характерных для участков гран. Эти результаты предполагают локализацию ФС I преимущественно в межгранных участках тилакоидов, а ФС II — только в участках плотных контактов тилакоидов гран [7].

Однако чтобы подтвердить это предположение, основанное на изменении морфологии ламеллярной системы хлоропластов, необходимо было визуально пронаблюдать за локализацией хлорофилл-белковых комплексов в мембране. Выявить локализацию белковых частиц в мембране с помощью электронного микроскопа позволяет метод замораживания-скалывания — Freeze-fracture. Анализ субчастиц (рис. 3), выявляе-

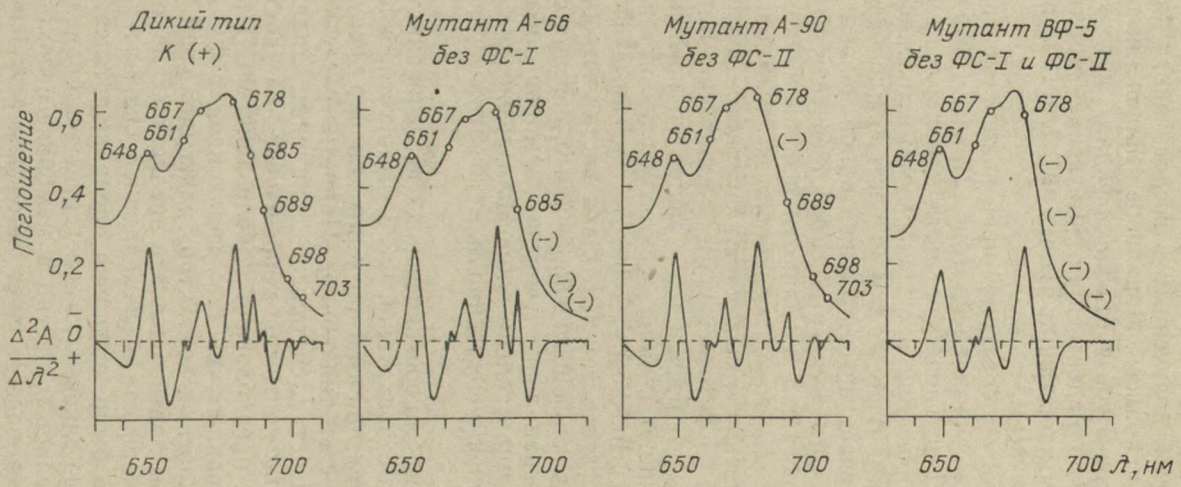


Рис. 2. Спектры поглощения хлорофилла и их вторые производные при —196 °С клеток дикого типа и мутантов, показывающие связь полос поглощения при 685, 689, 697 и 703 нм с комплексами ФС II и ФС I

Digital Library (repository) of Tomsk State University http://vital.lib.tsu.ru

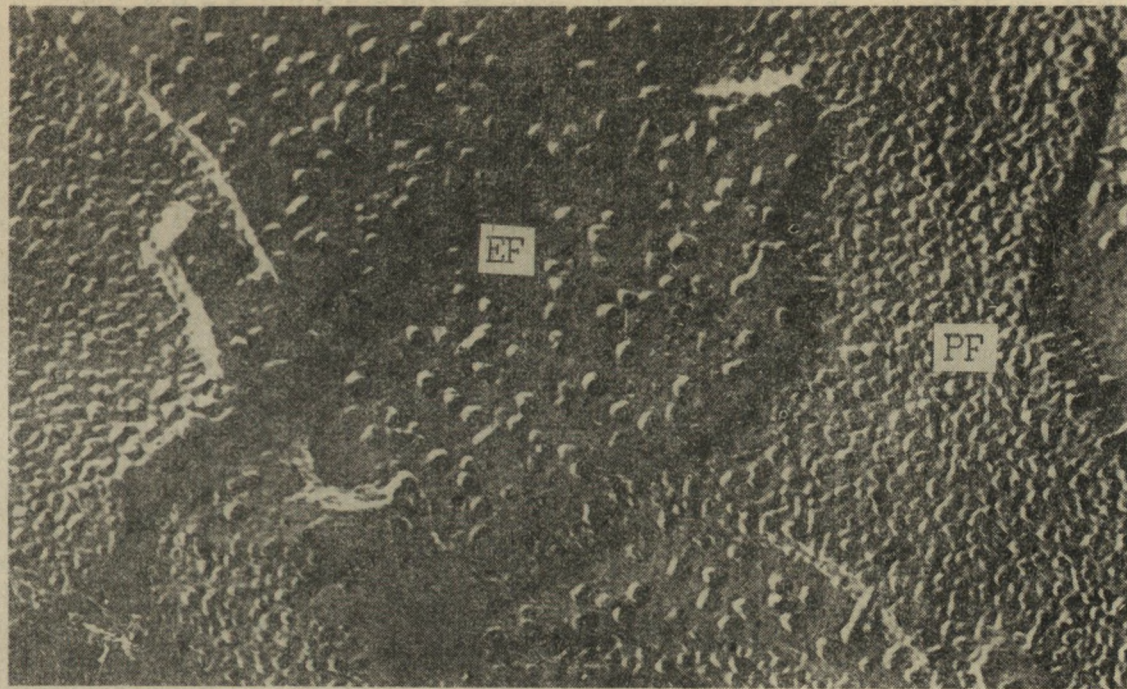


Рис. 3. Скол мембран хлоропластов при —140 °С в области граны, показывающий наличие двух комплементарных гидрофобных поверхностей внутри тилакоида. Крупные 160 Å субчастицы локализованы на внутренней половине тилакоида (EF), а 140 Å — на внешней (PF)

Digital Library (repository) of Tomsk State University http://vital.lib.tsu.ru

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

мых на гидрофобных поверхностях сколов замороженных мембран хлоропластов, позволил установить четкую корреляцию между отсутствием хлорофилл-белков ФС I у мутантов и 140 Å частицами на поверхности скола внешней половины мембраны тилакоидов (PF) межгранных участков. В то же время отсутствие хлорофилл-белков ФС II четко коррелирует с потерей 160 Å частиц на поверхности скола внутренней половины мембраны (EF) в участках контакта гранальных тилакоидов (таблица).

Число внутримембранных субчастиц на гидрофобных поверхностях сколов мембран хлоропластов дикого типа и мутантов, штук/мкм²

Штамм	EF-поверхность		PF-поверхность	
	Тилакоиды гран	Межгранные тилакоиды	Тилакоиды гран	Межгранные тилакоиды
Дикий тип	1100±140	450±83	4000±180	4400±500
Мутант А-90 без ФС II	—	150±56	—	3000±110
Мутант А-66 без ФС I	1200±64	—	4300±290	—
Мутант ВФ-5 без ФС I и ФС II	—	400±45	4000±240	—

Важно отметить, что у мутантов без хлорофилла **b** число 160 Å частиц не изменяется, но размеры их уменьшаются до 80—110 Å [9]. Этот факт указывает на то, что 160 Å субчастицы представляют собой агрегат, включающий хлорофилл-**a**-белок ФС II и хлорофилл-**a**/**b**-белок светособирающего комплекса. Кроме того, этот факт предполагает преимущественную локализацию хлорофилла **b** в гранальных участках мембран хлоропластов. Отсутствие хлорофилла **b** ведет к ослаблению контактов между тилакоидами гран, что служит указанием на важную роль этой части светособирающего комплекса в образовании контактов между тилакоидами в гранах. Хлорофилл-**a**-белок светособирающего комплекса показал преимущественную локализацию его в межгранных участках и, возможно, в виде агрегата в 140 Å субчастицах с комплексом ФС I. Правомочность такого предположения подтверждается тем, что потеря комплекса СР I не ведет к полной утрате 140 Å частиц, а лишь к уменьшению их размеров.

Следовательно, 140 Å субчастицы в межгранных участках

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

представляют собой агрегаты, включающие комплекс ФС I и 1—2 субъединицы светособирающего комплекса, а 160 Å субчастицы гран, помимо комплекса ФС II, включают 2—4 частицы светособирающего комплекса.

Локализация хлорофилл-белковых комплексов в гранальных и межгранных участках тилакоидов подчеркивает важность всей мембранной системы хлоропластов в высокоэффективном поглощении и запасании солнечной энергии в процессе фотосинтеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ладыгин В. Г., Семенова Г. А., Тагеева С. В. Развитие ламеллярной системы пластид у пигментных мутантов Chlamydomonas reinhardii. — Цитология, 1973, т. 15, № 7, с. 810—817.

2. Kahn K.-S., Thornber J. P. The light-harvesting chlrophyll a/b-protein complex of Chlamydomonas reinhardii. — Plant Physiol., 1976, v. 57, N 1, p. 47—52.

3. Ладыгин В. Г. Получение гибридного штамма Chlamydomonas с неактивными ФС I и ФС II и установление трех типов антенного хлорофилла в клетках in vivo. — Генетика, 1980, т. 16, № 6, с. 994—1001.

4. Ladygin V G., Bil' K. Ya. Chlorophyll form at 684 nm as antenna of photosystem II in chloroplasts of C_4-plant leaves. — Photosynthetica, — 1981, v. 15, N 1, p. 49—54.

5. Ладыгин В. Г. Получение и отбор мутантов одноклеточных водорослей с нарушениями цепи фотосинтетического переноса электрона. — Физиол. растений, 1976, т. 23, № 5, с. 877—884.

6. Ладыгин В. Г. Метод выделения нефотосинтезирующих мутантов водорослей по признаку карликовости колоний. — Генетика, 1977, т. 13, № 5, с. 905—909.

7. Ладыгин В. Г., Семенова Г. А., Тагеева С. В. Фотохимические свойства и структура мембран хлоропластов гибридного штамма Chlamydomonas с неактивнымии ФС I и ФС II. — Физиология растений, 1980, т. 27, № 1, с. 91—97.

8. Ладыгин В. Г., Фомина И. Р., Биль К. Я., Москаленко А. А., Ширшикова Г. Н. Идентификация хлорофилл-содержащих полос с использованием мутантов Chlamydomonas reinhardii. — Биохимия, 1983, т. 48, № 9, с. 1421—1428.

9. Semenova G. A., Ladygin V. G. Topography of thylakoid membranes of chloroplasts based on the analysis of Chlamydomonas mutants deficient in chlorophyll-protein complexes. — Photosynthetica, 1984, v. 18, N 1, p. 50—56.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ИЗМЕНЕНИЕ ВЕЛИЧИНЫ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ ЕДИНИЦЫ В ПРОЦЕССЕ ОНТОГЕНЕЗА ГОРОХА В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА ЖЕЛЕЗА

О. Н. Ладыгина, Д. А. Закржевский

Институт почвоведения и фотосинтеза АН СССР

В настоящее время не вызывает сомнений, что практически весь хлорофилл в хлоропластах связан со специфическими белками мембран, образуя пигмент-белковые комплексы [1]. Их взаимодействие обусловливает работу фотосистем и процесса фотосинтеза в целом. Каждый из комплексов имеет характерные полосы флуоресценции и поглощения хлорофилла [2], что позволяет на хлоропластах и целых листьях провести качественную оценку, какие из хлорофилл-белковых комплексов изменились в процессе того или другого воздействия. Анализ же светоиндуцированных изменений $П_{700}$ и $П_{680}$ дает возможность количественно рассчитать число реакционных центров и оценить величину фотосинтетической единицы.

Цель работы состояла в том, чтобы установить, как влияет дефицит железа на число реакционных центров фотосистемы I (ФС I) и на величину фотосинтетической единицы.

Методика

Работу проводили на хлоропластах и листьях гороха (Pisum sativum L.). Растения выращивали в климатической камере ШКВ-1 в водной культуре на среде Арнона, содержащей железо (контрольный вариант) и не содержащей железа (вариант по дефициту железа) в течение 25—30 суток при температуре 25° днем и 20° ночью, освещенности 50 Вт/м² и продолжительности светового периода 12 ч.

Содержание хлорофилла определяли спектрофотометрически в 100% ацетоне при 4 °С. Спектры поглощения хлорофилла и их вторые производные при —196 °С регистрировали с помощью двухлучевого и двухволнового спектрофотометра Hitachi — 356 с приставкой [2]. Фотоиндуцированные изменения выхода флуоресценции хлорофилла ФС II (переменная флуоресценция или ΔФ) и поглощения хлорофилла ФС I

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

при 700 нм ($П_{700}$) анализировали на фосфороскопической установке.

Амперометрическим методом по выделению O_2 оценивали фотосинтетическую активность листьев в условиях дефицита железа.

Результаты и обсуждение

Ранее мы установили, что выращивание растений гороха при дефиците железа не сразу приводит к проявлению хлороза на уровне листа. В первые две недели содержание пигментов остается близким к контрольному. Дальнейшее онтогенетическое развитие растений гороха при дефиците железа сопровождается уменьшением содержания пигментов у 5-го листа до 50—60% от их уровня в листьях контрольных растений при расчете на г сырой массы. В течение четвертой недели роста дефицит железа существенно сказывается на формировании пигмент-белковых комплексов хлоропластов, поэтому 6-й лист становится светло-зеленым и накапливает лишь 30%, а 7-й желтый — не более 10—15% пигментов.

Следует, однако, отметить, что усиливающийся хлороз снижает фотосинтетическую активность и дыхание лишь в расчете на 1 г сырой массы и на 1 $дм^2$ площади листа. Если проанализировать активность фотосинтеза на 1 мг хлорофилла, то оказывается, что она не только не снижается, но и возрастает (таблица). Этот факт предполагает изменение соотноше-

Скорость фотосинтеза, число реакционных центров ФС I и величина фотосинтетической единицы в хлоропластах гороха, выращенного при дефиците железа

Условия опыта	Фотосинтез, мкмолей O_2 / мг хл·ч	Число РЦ ФС I $\times 10^{14}$			Фотосинтетическая единица
		на 1 г сырой массы	на 1 $дм^2$ площади листа	на 1 мг хлорофилла	
Контроль	54,9±3,2	18,3	38,2	7,3	794±89
Зеленый лист № 5	50,3±4,1	11,8	23,3	8,2	820±73
Светло-зеленый лист № 6	68,5±3,7	6,3	10,8	9,4	660±54
Желтый лист № 7	74,9±5,3	4,4	6,1	12,6	530±41

Примечание: Число реакционных центров и величину фотосинтетической единицы рассчитывали на основании светоиндуцированных изменений поглощения хлорофилла ФС I при 700 нм ($П_{700}$).

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ния суммы хлорофилла к числу реакционных центров при культивировании растений гороха в условиях дефицита железа.

Качественную оценку изменений в соотношении пигмент-белковых комплексов фотосистем и светособирающего комплекса можно провести по анализу спектральных свойств хлорофиллов целых листьев [2]. Анализ спектров поглощения хлорофилла и их вторых производных показал (рис. 1), что все листья опытных растений имеют максимумы, характерные для контрольных листьев, что указывает на сохранение у них всех пигмент-белковых комплексов. Наличие полос при 650 и 660—780 нм указывает на сохранение светособирающего хлорофилл-**a**/**b**-белкового комплекса. Присутствие полосы поглощения при 684 нм указывает на сохранение хлорофилл-**a**-белкового комплекса ФС II, а выявление у них полос при 690, 697 и 708 нм — на наличие хлорофилл-**a**-белкового комплекса ФС I [3].

Исследование светоиндуцированных изменений поглощения $П_{700}$ ФС I и выхода переменной флуоресценции и послесвечения хлорофилла ФС II (рис. 2) подтвердило присутствие в хлоропластах фотохимически активных реакционных центров ФС I и ФС II. И хотя фотохимическая активность ФС II в желтых № 7 железо-дефицитных листьях гороха подавлена в большей степени, чем ФС I, оба типа реакционных центров в них сохраняются.

Важно было изучить, как изменяется число реакционных центров и величина общей светособирающей антенны (фотосинтетической единицы) в листьях растений, выросших при дефиците железа. Величину фотосинтетической единицы определяли как отношение числа молекул хлорофиллов (**a**+**b**), поделенных на число реакционных центров ФС I и ФС II. Учитывая, что измерения светоиндуцированного изменения поглощения $П_{700}$ дает надежные и стабильные результаты, мы определили величину фотосинтетической единицы, исходя из числа реакционных центров ФС I, как это было сделано на листьях свеклы [4].

Анализ числа реакционных центров показал, что в расчете на 1 г сырой массы и 1 дм^2 площади листа их исходная величина в процессе усиливающего хлороза опытных листьев постепенно уменьшается (см. таблицу). В то же время в пересчете на 1 мг хлорофилла этих же листьев число реакционных центров увеличивается.

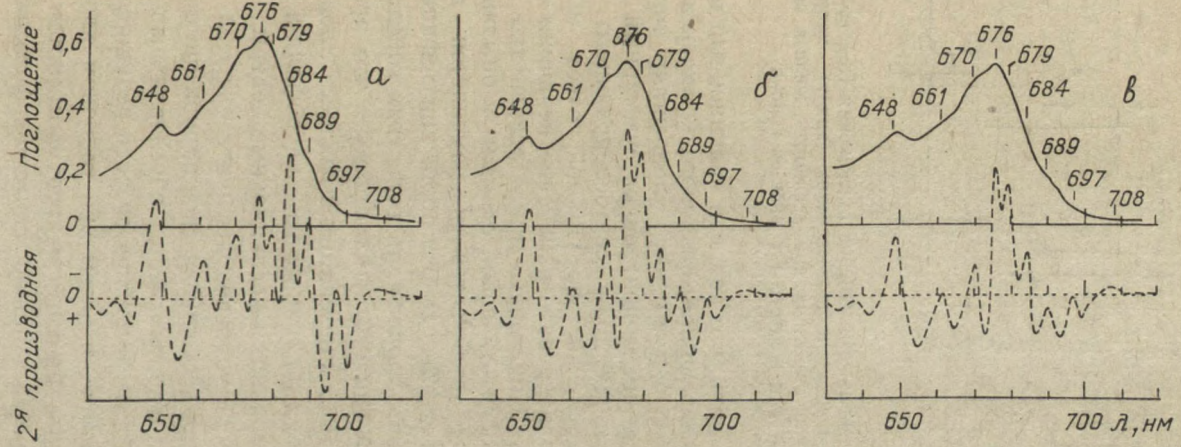
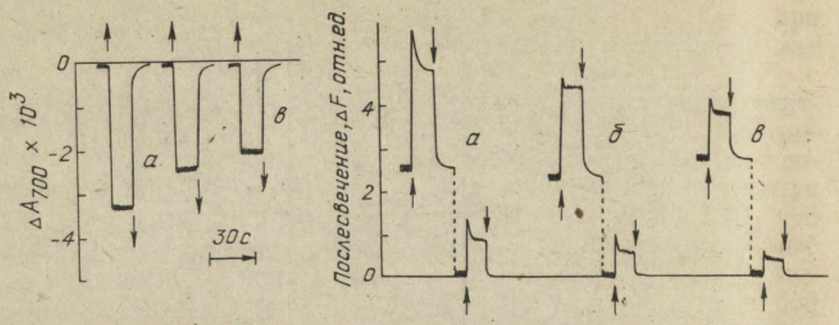


Рис. 1. Спектры поглощения хлорофилла и их вторые производные при —196 °С контрольных листьев (*а*) и выросших при дефиците железа, светло-зеленого (*б*) и желтого (*в*) листьев гороха

Digital Library (repository) of Tomsk State University http://vital.lib.tsu.ru

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru



Рисч 2. Светоиндуцированные изменения поглощения $П_{700}$ (ΔA_{700}), выхода флуоресценции (ΔF, вверху) и послесвечения (внизу) хлорофилла контрольных листьев (*а*) и выросших при дефиците железа светло-зеленого (*б*) и желтого (*в*) листьев гороха

Если предположить, что каждый реакционный центр ФС I входит в состав хлорофилл-а-белкового комплекса с практически постоянным числом молекул хлорофилла, тогда относительное увеличение числа центров на суммарный хлорофилл указывает на снижение доли светособирающего комплекса у наиболее хлорозных листьев. Прямой ответ можно получить, если проанализировать изменение величины фотосинтетической единицы. Полученные нами результаты показали, что величина фотосинтетической единицы у опытных зеленых листьев № 4 и 5 не отличается и изменяется в пределах ошибки. В условиях длительного роста при дефиците железа по мере разрушения хлорофилла в листьях гороха величина фотосинтетической единицы уменьшается, что предполагает более сильное разрушение светособирающего хлорофилл-а/b-белкового комплекса по сравнению с хлорофилл-а-белковыми комплексами, содержащими реакционные центры.

Таким образом, в условиях дефицита железа в листьях гороха наблюдается неспецифическое нарушение пигмент-белковых комплексов хлоропластов, обусловливающих появление хлороза. При этом в первую очередь редуцируется светособирающий комплекс, а затем при глубоком хлорозе резко снижается число реакционных центров фотосистем, что является одной из основных причин снижения фотосинтетической активности и продуктивности растений.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ЛИТЕРАТУРА

1. Markwell J. P., Thornber J. P. Boggs R. T. Higher plant chloroplasts: Evidence that all chlorophyll exists as chlorophyll-protein complexes. — Proc. Natl. Acad. Sci., 1979, v. 76, p. 1233—1235.

2. Ладыгин В. Г. Спектральные формы хлорофилла мутантов Chlamydomonas с неактивными фотосистемами. — Биофизика, 1979, т. 24, вып. 2, с. 254—259.

3. Ладыгин В. Г., Биль К. Я., Божок Г. В. Формы хлорофилла и структура хлоропластов мутантов Pisum sativum с нарушенной активностью фотосистемы I или фотосистемы II. — Физиол. растений, 1982, т. 29, вып. 3, с. 479—487.

4. Spiller S., Terry N. Limiting factors in photosynthesis. II. Iron stress diminishes photochemical capasity by reducing the number of photosynthetic units. — Plant Physiol., 1980, v. 65, N 1, p. 121—125.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ВИОЛАКСАНТИНОВОГО ЦИКЛА В ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНОЙ ЦЕПИ ХЛОРОПЛАСТОВ

Г. Н. Ширшикова

Институт почвоведения и фотосинтеза АН СССР

Более 20 лет назад было установлено, что в пластидах зеленого листа в процессе фотосинтеза происходит превращение виолаксантина в зеаксантин на свету через промежуточный пигмент антераксантин. Эти превращения получили название виолаксантинового цикла [1—3]. Цикл включает в себя две реакции: прямая дезэпоксидации идет на свету с выделением кислорода, обратная протекает в темноте с поглощением O_2.

Тот факт, что эти превращения осуществляются с участием фотохимических реакций ФС I и ФС II электрон-транспортной цепи хлоропластов, не вызывает сомнений. Но существуют разные точки зрения на локализацию виолаксантинового цикла в фотосинтетической электрон-транспортной цепи. В ряде работ Сапожникова с сотр. (1965, 1966) высказывалось мнение о локализации виолаксантинового цикла вблизи ФС II. Авторы полагали, что в окислительно-восстановительных реакциях виолаксантинового цикла используется O_2 воды, выделение которого обусловлено работой реакционного центра ФС II. Но в литературе известны и совершенно противоположные высказывания о связи виолаксантинового цикла с функционированием ФС I. В частности, в работе Мароти и Патаки [4] исследовалась зависимость светоиндуцированной трансформации виолаксантина, осуществляемая дезэпоксидазой по отношению к стромальным тилакоидам. Показано, что количество трансформированного на свету виолаксантина действительно хорошо коррелирует с относительным содержанием одиночных межгранных тилакоидов. А, как известно, в одиночных межгранных тилакоидах локализована преимущественно функционально активная ФС I.

Цель нашей работы состояла в том, чтобы с помощью мутантов одноклеточной зеленой водоросли Chlamydomonas reinhardii, не содержащих либо ФС I, либо ФС II, устано-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

вить, функционирование какой фотосистемы обязательно для осуществления реакций виолаксантинового цикла.

Методика

В работе использовали клетки дикого типа, имеющие функционально активные обе фотосистемы, и двух мутантов одноклеточной зеленой водоросли Chlamydomonas reinhardii, не содержащие либо ФС I (А-66), либо ФС II (АС-864). Все штаммы выращивали 3—5 суток на чашках Петри при температуре 23—25° и освещенности 1000 лк на 2% агаризованной минеральной среде с 0,2% ацетата натрия. Из осадка клеток получали 100% ацетоновый экстракт и наносили его на хроматограмму. Разделение каротиноидов проводили методом тонкослойной хроматографии [2] в модификации Корнюшенко [5] на стеклянных пластинках размерм 20×20 см. Смесь адсорбентов брали в соотношении $CaCO_3 : MgO : Ca(OH)_2 = 30 : 6 : 5$. Для разгонки ксантофиллов использовали смесь растворителей в соотношении бензин : ацетон : хлороформ = 50 : 50 : 40, для разделения каротинов — бензин : хлороформ = 100 : 3. Для элюции разделенных ксантофиллов использовали этиловый спирт (96°), а каротинов — хлороформ.

Результаты и обсуждение

Для решения поставленной задачи был проведен анализ каротиноидного состава контрольного дикого штамма хламидомонады К(+) и мутантов, не содержащих либо ФС I, либо ФС II. Полученные результаты показали (рис. 1), что клетки дикого типа содержат значительное количество виолаксантина и гораздо меньше зеаксантина, который с трудом отделяется от идущей рядом полосы. Относительное соотношение виолаксантин : антераксантин : зеаксантин = 56 : 21 : 23.

У мутанта АС-864 без ФС II, выросшего на свету, резко возрастает количество зеаксантина по сравнению с диким типом и уменьшается количество виолаксантина. Соотношение виолаксантин : антераксантин : зеаксантин = 10 : 25 : 65. Следовательно, в отсутствие ФС II прекрасно работает световая стадия цикла с образованием зеаксантина.

Исследование каротиноидов мутанта А-66 без ФС I показало, что он содержит значительное количество виолаксантина и меньше антераксантина и зеаксантина. Относительное содержание пигментов виолаксантин : антераксантин : зеаксан-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

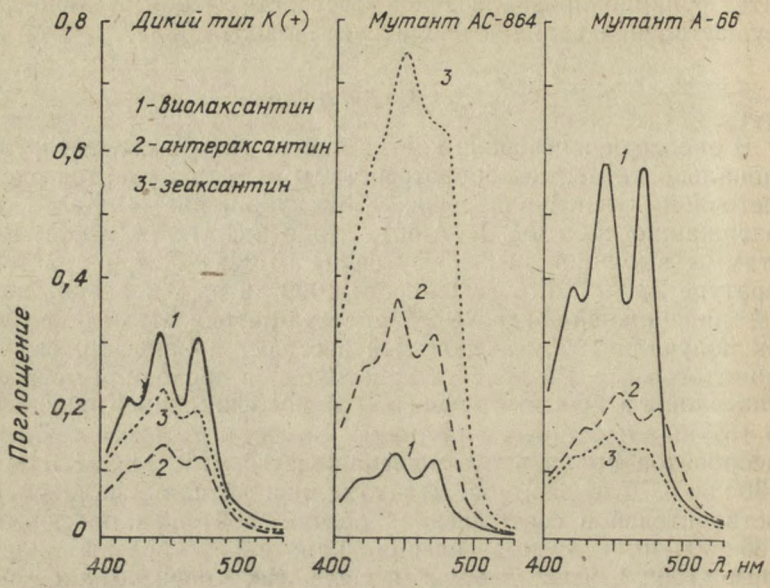


Рис. 1. Спектры поглощения каротиноидов виолаксантинового цикла, показывающие относительное их накопление в клетках дикого типа К (+) и мутантов без ФС II АС-864 и без ФС I А-66. Элюаты каждого из образцов получены с одной хроматограммы

тин = 55 : 31 : 14 предполагает затрудненное превращение виолаксантина в зеаксантин.

Промежуточный пигмент антераксантин присутствует практически во всех исследованных клетках в небольших количествах, а мутант А-66, не имеющий ФС I, содержит увеличенное его количество по сравнению с клетками дикого типа, что предполагает необходимость активной ФС I в формировании зеаксантина. Количественное содержание пигментов в процентах и мкг/10^7 клеток отражено в таблице. В зависимости от условий выращивания штаммов содержание отдельных пигментов может немного изменяться, но отмеченная закономерность всегда сохраняется.

По химическому строению каротиноиды являются ненасыщенными соединениями. Они содержат значительное количество двойных связей. Можно предполагать, что в растении каротиноиды являются переносчиками активного кислорода и принимают участие в окислительно-восстановительных про-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Содержание каротиноидов в клетках дикого типа и мутантов А-66 с неактивной ФС I и АС-864 с неактивной ФС II

Каротиноиды	мкг/10^7 клеток			% от суммы		
	К (+)	А-66	АС-864	К (+)	А-66	АС-864
Каротин	1,43	1,18	0,93	18,5	17,8	19,5
Виолаксантин	1,38	1,17	0,19	17,9	17,7	4,0
Лютеин	1,87	1,59	2,05	24,4	24,2	42,9
Антераксантин	0,41	0,52	0,37	5,3	7,9	7,9
Неоксантин нео А	0,34	0,32	—	4,4	4,8	—
Неоксантин	0,97	0,99	—	12,6	15,0	—
Зеаксантин	0,27	0,30	1,22	3,5	4,5	25,7
Неидент. ксантофилл	1,03	0,53	—	13,4	8,1	—

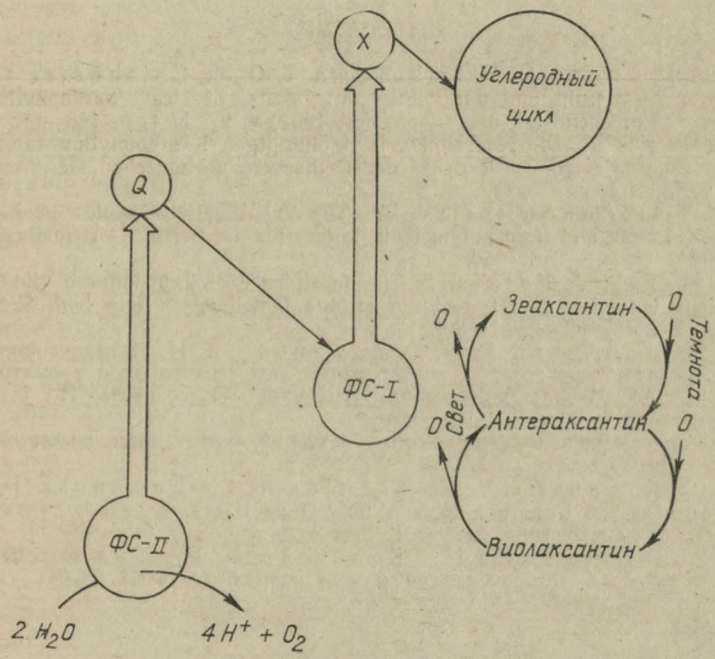


Рис. 2. Схема, показывающая сопряжение реакций виолаксантинового цикла с активностью ФС I электрон-транспортной цепи хлоропластов

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

цессах. На это указывает широкое распространение в растениях кислородных производных каротиноидов — эпоксидов, чрезвычайно легко отдающих свой кислород [6].

В результате реакций дезэпоксидации — эпоксидации, происходящих в виолаксантиновом цикле, на свету выделяется кислород, в темноте он поглощается. Исходя из полученных нами результатов можно сделать вывод, что для функционирования виолаксантинового цикла с образованием зеаксантина на свету не требуется функционирования ФС II, что исключает также возможность участия этого цикла в механизме фотоокисления воды и выделения O_2. В то же время функционирование ФС I существенно усиливает процесс превращения виолаксантина до конечного продукта — зеаксантина, что дает основание предполагать локализацию цикла вблизи ФС I (рис. 2). В пользу этого говорит и торможение процесса при нарушении активности ФС I.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yamamoto H. Y., Nakayama T. O. M., Chichester C. O. Studies on the light and dark interconversions of leaf xantophylls. — Archives of biochemistry and biophysics, 1962, v. 97, N 1, p. 168—173.

2. Hager A. Die reversiblen, lichtabhangigen Xanthophyllumwandlungen in Chloroplasten. — Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft, 1975, v. 88, N 1, p. 27—44.

3. Siefermann-Harms D. The xanthophyll cycle in higher plants. — Lipids and lipid polymers in higher plants. Berlin — Heidelberg — New-York, 1977, p. 218—230.

4. Maroti J., Pataky S. The dependence of light-induced violaxanthin transformation on the ratio of stroma lamellae. — Acta biol. Szeged, 1983, v. 29, N 1—4, p. 201—202.

5. Корнюшенко Г. А., Сапожников Д. И. Методика определения каротиноидов зеленого листа с помощью тонкослойной хроматографии. — В кн.: Методы комплексного изучения фотосинтеза. Л.: Изд-во Лен. ун-та, 1969, с. 181—192.

6. Кретович В. Л. Биохимия растений. — М.: Высш. школа, 1986, с. 275.

7. Сапожников Д. И., Маслова Т. Г., Бажанова Н. В., Попова О. Ф. Кинетика включения ^{18}O из $H_2{}^{18}O$ в виолаксантин. — Биофизика, 1965, т. 10, с. 349—351.

8. Сапожников Д. И., Колотова Л. Р., Гиллер Ю. Е. Спектр действия дезэпоксидации виолаксантина. — ДАН СССР, 1966, т. 171, с. 740—741.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

АНАЛИЗ СОСТАВА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ И ИХ БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ У ДВУХ ПИГМЕНТНЫХ МУТАНТОВ CHLAMYDOMONAS REINHARDII

А. С. Чунаев, Н. Г. Аверина, А. Бошетти, Е. М. Чекунова, Н. В. Шалыго

Биологический научно-исследовательский институт
при Ленинградском университете
Институт фотобиологии АН СССР
Институт биохимии Бернского университета

Мутантные организмы широко используются для выявления индивидуальных клеточных компонентов, участвующих в выполнении той или иной конкретной биологической функции. Известны многочисленные примеры успешного использования мутантов при изучении фотосинтеза, фотодыхания, хлоропластового дыхания [1].

Разрешающая способность анализа биологических функций с помощью мутантов зависит от степени их генетической изученности. У организмов с половым процессом гибридологический анализ позволяет свести нарушения у мутантов к мутациям отдельных генов. Анализ разнообразия фенотипических проявлений мутаций отдельных генов (так называемых плейотропных эффектов) дает ответ на вопрос, какие изменения клеточных компонентов являются первичным следствием нарушения структуры того или иного гена. Методы молекулярной генетики повышают разрешающую способность анализа мутантов вплоть до выяснения значимости отдельных нуклеотидов в молекуле ДНК для функциональных свойств соответствующих полипептидов, выявляемых in vivo [2].

Одним из основных классов мутантов растений и водорослей, используемых для изучения фотосинтеза и фотодыхания, являются мутанты с измененной пигментацией. У этих мутантов установлены нарушения в митохондриях, в оболочке хлоропласта, в содержании компонентов хлоропластных рибосом, в составе фотосинтетических мембран [1]. Одни и те же пигментные мутанты рассматриваются и как мутанты по «рибосомным» генам, и как мутанты с нарушениями фотосистем [3, 4]. Вместе с тем очевидно, что существенная часть пиг-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ментных мутантов должна быть представлена мутантами по генам, кодирующим ферменты биосинтеза хлорофилла и каротиноидов.

В настоящей работе проведен анализ содержания фотосинтетических пигментов и некоторых их биосинтетических предшественников у двух светло-зеленых мутантов Chlamydomonas reinhardii, имеющих нарушения в двух различных несцепленных между собой ядерных генах [5].

Материалы и методы

В работе использовали штамм Chlamydomonas reinhardii 11-32 f с нормальной пигментацией (генотип arg-7—8 mt+) и полученные от него под действием УФ-излучения пигментные мутанты pg-101 и pg-113. Для анализа содержания пигментов методом жидкостной хроматографии высокого разрешения (ЖХВР) клетки выращивали в жидкой среде [6], содержащей 0,47 мМ аргинина·HCl. Гетеротрофные и миксотрофные культуры выращивали в той же среде с добавкой 14,7 мМ ацетата натрия. Клетки для анализа собирали из культур находящихся в поздней экспоненциальной фазе ($2—4\times\times10^6$ кл·мл$^{-1}$). Анализ содержания биосинтетических предшественников хлорофилла проводили в культурах, выращенных на плотной среде [7] в миксотрофных условиях в течение 5 суток на непрерывном свету (2000 лк) при 25 °С.

Клетки из жидких культур осаждали и пигменты экстрагировали 80% ацетоном (4 мл/100 мкг хлорофилла). К этому экстракту добавляли 4 мл диэтилового эфира и 0,8 мл 4 М NaCl. После разделения фаз слой эфира реэкстрагировали дважды тем же объемом 0,4 М NaCl, сушили с помощью безводного Na_2SO_4, выпаривали в потоке N_2 и остаток растворяли в растворителе А (ацетонитрил/метанол/тетрагидрофуран, в соотношении объемов 75 : 15 : 10). Разделение пигментов с помощью ЖХВР было проведено согласно [8] с использованием колонки Nucleosil SC 18 OD, 250×4 mm (Knauer, FRG). Элюция проводилась с градиентом, образуемым от 75 до 100% растворителя А в воде за 35 мин. Скорость течения составляла 1 млн·мин$^{-1}$, оптическая плотность элюата регистрировалась при 445 нм. Хлорофиллы и ксантофиллы легко разделялись с помощью градиента растворителя, указанного выше, тогда как каротины лучше разделялись при тех же условиях, но с ацетонитрилом в качестве растворителя. Содержание пигментов рассчитывали как весовые % от-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

носительно хлорофилла **a** из интегрированных площадей под пиками на ЖХВР-регистрограмме по следующей формуле:

$$\text{весовой } \% = \frac{A_x \cdot B_{max.x} \cdot B_{455,chla} \cdot E^{1\%}_{max.chla}}{A_{chla}\ E_{445,x} \cdot E_{max.chla} \cdot E^{1\%}_{max.x}} \qquad (1)$$

где A_x, A_{chla} — площади под пиком *x* и пиком хлорофилла **a**, соответственно; E_{445}, E_{max} — поглощение при 445 нм и в максимуме вещества *x* или хлорофилла **a** в растворителе для ЖХВР; $E^{1\%}_{max}$ — коэффициент поглощения в петролейном эфире (каротины), этаноле (ксантофиллы) или ацетоне (хлорофиллы). Масс-спектрометр Varian-Mat CH7A с непосредственной инъекцией образцов использовался для идентификации лороксантина.

Для анализа предшественников хлорофилла чашки Петри с культурами помещали в кипящую водяную баню, клетки фиксировали в течение 3 мин паром. Затем биомассу клеток собирали шпателем, взвешивали и растирали с $CaCO_3$ под слоем 100% ацетона, полученный гомогенат центрифугировали 15 мин при 6000 g и затем содержание ацетона в супернатанте доводили до 85% с помощью 0,1 н раствора NH_4OH. Анализ бесфитольных предшественников хлорофилла в отмытом гексаном щелочном ацетоне проводили спектрофлуорометрически на установке и при условиях, описанных ранее [9]. Гексан, содержащий хлорофиллы **a** и **b**, упаривали досуха под N_2, пигменты переводили в диэтиловый эфир и их содержание определяли из спектров флуоресценции, используя длины волн возбуждения 435 и 450 нм соответственно и стандартные градуировочные кривые перехода от относительных интенсивностей флуоресценции пигментов к их количествам.

Результаты

Содержание пигментов определяли после их разделения посредством ЖХВР (рис. 1, табл. 1). Эти данные находятся в соответствии с определениями пигментного состава, проведенными в работе [10]. Вещества были идентифицированы по спектрам в УФ и видимой области и посредством ко-хроматографии тех же веществ из шпината. Для лороксантина, тригидрокси-каротина, содержащего гидроксиметильную группу в цепи, были получены также данные масс-спектрометрии. Они показывают сигналы при m/z 584 (M^+), 492 (M-94) и 462 (M-122), которые типичны для этого каротиноида [11, 12]. Пик *5* не был идентифицирован, он, однако, не идентичен зе-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

аксантину, который мигрирует между пиками *4* и *5* на ко-хроматограмме. В конце хроматограммы элюируется небольшое количество α-каротина (но не λ-каротина и не ликопина) перед основным пиком *9*, образуемым β-каротином. Как α-, так и β-каротины, по-видимому, присутствуют, по крайней мере, в виде двух изомеров каждый. Продукты деградации (хлорофиллиды a и b и окисленные каротиноиды) присутствовали в препаратах, хранившихся какое-то время до проведения анализа и элюировались в самом начале разгонки. Они не мешали выявлению нативных компонентов.

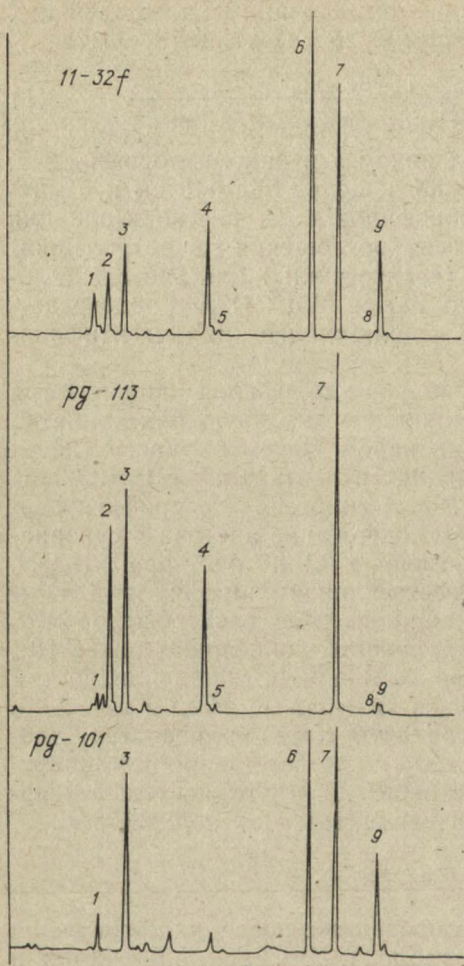


Рис. 1. Разделение методом жидкостной хроматографии высокого разрешения пигментов, экстрагированных из исходного штамма 11-32 f и из пигментных мутантов pg-113 и pg-101 Chlamydomonas reinhardii, выращенных в миксотрофных условиях (на свету в среде с ацетатом): *1* — неоксантин; *2* — лороксантин; *3* — миолаксантин; *4* — лютеин; *5* — неидентифицированный пигмент; *6* — хлорофилл b; *7* — хлорофилл a; *8* — α-каротин; *9* — β-каротин

Данные количественного определения пигментов в клетках нормально пигментированного штамма 11-32 f и двух мутантов pg-113 и pg-101 суммированы в табл. 1. При различных условиях культивирования (на свету без ацетата, на свету и в темноте с ацетатом) можно наблюдать некоторые ва-

Таблица 1

Пигментный состав клеток штаммов Chlamydomonas reinhardii

№ пика (рис. 1)	Соединение	Количество молекул/100 молекул хлорофилла а									
		Исходный штамм 11-32f			Мутант pg-113			Мутант pg-101			Шпинат
		С—ац.	С+ац.	Т+ац.	С—ац.	С+ац.	Т+ац.	С—ац.	С+ац.	Т+ац.	
1	Неоксантин	7,2	5,8	7,7	1,1	1,3	4,0	5,0	4,6	2,4	5,9
2	Лороксантин	12,3	7,4	12,1	9,7	13,3	8,7	—	—	—	—
3	Виолаксантин	9,2	10,4	14,1	9,2	16,4	20,5	23,1	20,7	23,7	19,3
4	Лютеин	16,7	13,0	11,5	12,7	11,0	38,8	1,5	2,2	1,3	23,0
5	Неизвестно	0,5	0,4	0,3	сл.	0,6	1,3	0,1	0,2	сл.	0,7
6	Хлорофилл b	49,7	42,5	44,5	1,2	1,4	1,5	31,9	33,2	18,1	41,5
7	Хлорофилл а	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
8	α-каротин	0,8	0,7	0,4	0,6	0,2	0,3	—	—	—	сл.
9	β-каротин	13,2	11,5	17,6	5,4	1,8	23,2	20,3	12,9	16,5	11,6
Кол-во определений		4	1	3	2	3	3	3	2	3	1

Примечание. Условия выращивания: С—ац. — на свету без ацетата; С+ац. — на свету с ацетатом; Т+ац.— в темноте с ацетатом; сл.— следы.

Digital Library (repository) of Tomsk State University http://vital.lib.tsu.ru

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

риации в составе пигментов. Однако различия между мутантами и исходным штаммом гораздо более выражены.

У мутанта pg-113 содержание хлорофилла **b** резко снижено, хотя и не до полного отсутствия. В то же время содержание неоксантина резко уменьшено. В противоположность мутанту pg-113 у мутанта pg-101 с уменьшенным содержанием хлорофилла **b** наиболее очевидное различие от исходного штамма состоит в полном отсутствии лороксантина. Более того, α-каротин отсутствует и пик лютеина уменьшен. Возможно, что этот остаточный пик представляет собой небольшое количество зеаксантина, который в других штаммах в норме скрыт лютеином. Создается впечатление, что в этом мутанте невозможно образование α-структуры каротиноидов.

Таблица 2

Содержание хлорофиллов и их биосинтетических предшественников в культурах штаммов Chlamydomonas reinhardii, выращенных на плотной среде с ацетатом на свету, нм/г сырой массы

Пигменты	Исходный штамм 11-32 f	Мутант pg-113	Мутант pg-101
Хлорофилл **a**	5053	4771	3901
Хлорофилл **b**	2416	—	1168
Хлорофиллид **a**	26,8	55,5	5,8
Хлорофиллид **b**	10,0	—	1,6
Протохлорофиллид	3,5	сл.	1,2
Mg-протопорфирин IX-монометиловый эфир	0,09	—	0,04

Как видно из табл. 2, у мутанта pg-113, выращенного на плотной среде в миксотрофных условиях, наблюдается снижение содержания биосинтетических предшественников хлорофилла — магний-протопорфирин-монометилового эфира и протохлорофиллида. Высокое содержание хлорофиллида **a** у мутанта pg-113, вероятно, является следствием высокой хлорофиллазной активности в культуре этого штамма. Для мутанта pg-101 не характерны контрастные изменения в содержании биосинтетических интермедиатов биосинтеза хлорофилла.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Обсуждение

Наиболее контрастным изменением пигментного состава, отличающим мутант pg-113 от исходного штамма 11-32 f является резкое снижение содержания хлорофилла **b**. Это нарушение связано с наличием мутации в одном ядерном гене cbn-l [5]. Белки апопротеины светособирающего хлорофилл-**a**/**b**-белкового комплекса, ответственные за связывание хлорофилла **b**, присутствуют у мутанта pg-113 в нормальных количествах [13]. Эти белки находятся под контролем нескольких ядерных генов [2], так что генетическое нарушение у мутанта pg-113, по всей вероятности, специфически связано с биосинтезом хлорофилла **b**. В этим предположением согласуется обнаруженное нами снижение содержания биосинтетических предшественников хлорофилла у мутанта pg-113 (табл. 2). Вместе с тем, первичная природа блока у мутанта pg-113 остается неустановленной. В недавней публикации Беднарик и Хубер [14] описали условия наблюдения реакции биосинтеза хлорофиллида **b** из протохлорофиллида у Chlamydomonas reinhardii y-l. Нарушение этой реакции в условиях, когда нормально идет биосинтез хлорофилла **a**, может приводить к фенотипическим эффектам, наблюдаемым у штамма pg-113. Для него, как и для других аллельных мутантов по гену cbn-l [15], характерно снижение содержания неоксантина. Можно предположить, что биосинтез неоксантина специфическим образом зависит от наличия хлорофилла **b** или ферментов его биосинтеза.

В противоположность этому у мутанта pg-101 не снижение содержания хлорофилла **b**, а отсутствие каротиноидов с α-иононовым кольцом является первичным следствием мутации. Уменьшение содержания хлорофилла **b**, как мы полагаем, является вторичным эффектом. Анализ пигментного состава хлорофилл-белковых комплексов, изолированных из тилакоидов шпината, выявил наличие постоянного отношения лютеина к хлорофиллу **b** [8]. Известно, что в образовании комплекса с хлорофиллом **b** участвует гидроксильная группа молекулы лютеина [8]. Вероятно, лороксантин также способен аналогичным образом комплексироваться с хлорофиллом **b**.

Таким образом, полученные данные соответствуют предположению, что у исследованных мутантов нарушены структурные гены по отношению к биосинтезу пигментов. Наряду с

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

уменьшением содержания пигментов контрастные изменения обнаружены на уровне их биосинтетических предшественников (Mg-протопорфирин IX-монометилового эфира, протохлорофиллид, α-каротин). Судя по содержанию хлорофиллов у гетерозиготных диплоидов, исследованные нами мутации рецессивны [5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Somerville C. R. Analysis of photosynthesis with mutants of higher plants and algae. — Ann. Rev. Plant Physiol., 1986, p. 467.

2. Чунаев А. С. Клонированные гены, кодирующие белки хлоропласта. — В кн.: Исследования по генетике. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1986, № 10, с. 3.

3. Квитко К. В., Тугаринов В. В. Генетико-биохимическое изучение действия генов, детерминирующих признаки хлоропласта у зеленых водорослей. — В кн.: Тез. симпозиальных докл. 4-го съезда ВОГиС им. Н. И. Вавилова. М.: Наука, 1982, с. 162.

4. Gyurján I., Erdös G., Paless Gy., Nagy A. H., Popova M. A. Analyses of thylakoid membrane polypeptides from photosystem I and II deficient mutants of Chlamydomonas reinhardii by two-dimentional electrophoresis. — Biochem. Physiol. Pflanzen, 1984, v. 179, p. 585.

5. Мирная О. Н., Бошетти А., Чунаев А. С. Генетический анализ пигментных мутантов Chlamydomonas reinhardii, имеющих нарушения хлорофилл-a/b-белкового комплекса. — В кн.: Тез. докл. Всес. конф. «Актуальные проблемы современной альгологии». Киев: Наукова думка, 1987, с. 48.

6. Sager R., Granick S. Nutritional control of sexuality in Chlamydomonas reinhardii. — J. Gen. Physiol., 1954, v. 37, p. 729.

7. Квитко К. В. Биология и генетика штаммов 137 с Chlamydomonas reinhardii. — В кн.: Экспериментальная альгология. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1977, с. 75.

8. Brauman Th., Weber G., Grimme L. H. Carotenoid and chlorophyll composition of light-harvesting and reaction centre proteins of the thylakoid membrane. — Photochemistry and Photobiology, 1982, v. 1, p. 1.

9. Аверина Н. Г., Шалыго Н. В., Фрадкин Л. И. Определение Mg-порфирин IX монометилового эфира в листьях ячменя и пшеницы. — Вестн. АН БССР. Сер. биол. наук, 1980, № 6, с. 25.

10. Francis G. W., Knutsen G., Lien T. Loroxanthin from Chlamydomonas reinhardii. — Acta Chem. Scand., 1973, v. 27, p. 3599.

11. Aitzemüller K., Strain H. H., Svec W. A., Grandolfo M., Katz J. J. Loroxanthin, a unique xanthophyll from Scenedesmus obliquus and Chlorella vulgaris. — Phytochemistry, 1969, v. 8, p. 1761.

12. Nitsche H. Die Identität von Loroxanthin mit Pyrenoxanthin, Trollein und Trihydroxy-carotin. — Arch. Mikrobiol., 1974, v. 95, p. 79.

13. Michel H. P., Tellenbach M., Boschetti A. A. chlorophyll b-less mutant of Chlamydomonas reinhardii lacking in the light-harves-

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ting chlorophyll-a/b-protein compex but not in its apoproteins. — Biochim. Biophys. Acta, 1983, v. 725, p. 417.

14. Bednarik D. P., Hoober J. K. Synthesis of chlorophyllide b from protochlorophyllide in Chlamydomonas reinhardii y-1. — Science, 1985, p. 230, p. 450.

15. Чунаев А. С., Ладыгин В. Г., Гавриленко Т. А., Крэла Л. П., Корнюшенко Г. А. Наследование признака «отсутствие хлорофилла b и изменчивость светособирающего комплекса в мейотическом потомстве мутанта С-48 Chlamydomonas reinhardii. — Генетика, 1981, т. 17, с. 2013.

16. Sewe, K-U. and Reich R. Effect of molecular polarization on electrochromism of carotenoids. 2. Lutein-chlorophyll complex. Origin of field-indicating absorption change at 520 nm in membranes of photosynthesis. — Zeitschrift für Naturforschung, 1977, v. 32, N (3—4), p. 161.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

АДЕНИЛАТКИНАЗНЫЙ ПУТЬ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ У РАСТЕНИЙ

М. М. Окунцов

Калининградский государственный университет

В данное время под процессом фосфорилирования понимается образование аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) из аденозиндифосфорной кислоты (АДФ) и ортофосфата по формуле АДФ$+H_3PO_4=$АТФ. Из этой формулы следует, что количество синтезированных молекул АТФ должно равняться количеству использованных молекул АДФ. Замечено, что при освещении листьев содержание в них АТФ не всегда заметно изменяется. Интенсивность фотосинтетического фосфорилирования удалось значительно повысить с применением буферных смесей [1]. Арнон в своей работе по фотосинтетическому циклическому фосфорилированию применил буферную смесь с pH 8,3 [2]. Биосинтез АТФ может осуществляться и другим путем при помощи фермента аденилаткиназы (2.7.4.3), который катализирует реакцию с образованием АТФ—2АДФ$\rightleftarrows$ $\rightleftarrows$АТФ$+$АМФ. Эта реакция является обратимой, так как по обе стороны имеется одинаковое количество энергии [3]. Общие представления о роли фермента аденилаткиназы в образовании АТФ нами были высказаны ранее [4].

Целью данной работы является выяснение пути биосинтеза АТФ при участии фермента аденилаткиназы.

Методика

Растения — 7-дневные зеленые проростки ячменя. Условия обратимости фермента аденилаткиназы под воздействием pH среды нами выявлены в связи с его уникальной термостабильностью. Ингибирование активности аденилаткиназы было осуществлено 50% раствором азотнокислого свинца [5], определение активности в прямом и обратном направлениях проводилось разработанной нами методикой [6].

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Для определения активности фермента аденилаткиназы в прямом направлении (2АДФ→АТФ+АМФ) навеску свежих листьев (3 г) растирают в 10 мл трисбуфера с pH 8,3. После центрифугирования в течение 10 мин при 4 тыс. об/мин берут две пробы по 3 мл. В контрольную пробу добавляют ингибитор (4 мл 50% азотнокислого свинца) и 250 мкг АДФ. В опытную пробу вначале добавляют 250 мкг АДФ и оставляют на 15 мин, затем добавляют 4 мл 50% азотнокислого свинца. К осадку, выделенному центрифугированием, добавляют спиртовый раствор, и свинец удаляют пропусканием сероводорода. Адениловые нуклеотиды определяют методом бумажной хроматографии [7]. Активность аденилаткиназы в прямом направлении рассчитывают четырьмя способами: 1) по увеличению АТФ; 2) по увеличению АМФ; 3) по увеличению суммы АТФ+АМФ; 4) по уменьшению АДФ. Эти способы необходимы для расчета аденилаткиназного пути фосфорилирования.

При определении активности фермента аденилаткиназы в обратном направлении (АТФ+АМФ→2АДФ) ход анализа аналогичен, только навеску растирают в буфере Na_2HPO_4 лимонная кислота с pH 2,2. В контрольную и опытную пробы нужно добавлять в том же порядке сумму АТФ+АМФ по 125 мкг. Активность фермента в обратном направлении рассчитывается следующими четырьмя способами: 1) по уменьшению АТФ; 2) по уменьшению АМФ; 3) по уменьшению суммы АТФ+АМФ; 4) по увеличению АДФ.

Результаты и обсуждение

В данное время в системе адениловых нуклеотидов фотохимической реакцией считается образование АТФ из АДФ и ортофосфата в процессе фотосинтетического циклического фосфорилирования. Все остальные компоненты адениловой системы, в том числе два предшественника — аденин и аденозин, считаются темновыми, или термобиохимическими, так как их биосинтез зависит от температуры.

Нами проведены исследования по выявлению фотохимических и термобиохимических реакций в системе адениловых нуклеотидов, аденина и аденозина в этиопластах ячменя. [Окунцов М. М., Зибирева Н. И. Фотохимический биосинтез аденозина в этиопластах ячменя. — Вопросы фотосинтеза и продуктивность растений]. Для выяснения фотохимических реакций охлажденные этиолированные проростки ячменя при температуре —2 °С освещались светом люминесцентных ламп

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

интенсивностью 40 тыс. эрг/см^2·с при экспозиции 20 мин. Выявление термобиохимических реакций осуществлялось после последующего перенесения освещенных на холоде растений в темновую камеру на 3 ч при температуре +20 °С, этиопласты выделялись буферной смесью при pH 6,8.

Результаты исследований показали, что биосинтез аденозина осуществляется фотохимическим путем, так как на свету при отрицательной температуре его содержание в этиопластах ячменя увеличилось на 40,99%. Сумма адениловых нуклеотидов в этих условиях не изменилась, но произошла определенная перегруппировка компонентов адениловой системы. Количество АДФ уменьшилось на 15,61%, а сумма АТФ+АМФ увеличилась на 14,92% по сравнению с контролем. Эта перегруппировка в этиопластах ячменя на свету при отрицательной температуре произошла под влиянием фотохимической реакции и хорошо согласуется с реакцией фермента аденилаткиназы в прямом направлении. При последующем перенесении освещенных на холоде проростков в темную камеру при температуре +20 °С, где они выдерживались 3 ч, сумма адениловых нуклеотидов увеличилась на 53,10%. Это говорит о том, что биосинтез осуществился термобиохимическим путем и связан с фотохимическим биосинтезом аденозина.

Условия обратимости фермента аденилаткиназы под воздействием pH среды нами были выявлены в связи с уникальной термостабильностью фермента. При кипячении растительной ткани в течение 90 мин, когда остается активным только фермент аденилаткиназа, в охлажденном и центрифугированном растворе при pH 8,3 аденилаткиназа полностью переводит экзогенную АДФ в АТФ и АМФ (прямая реакция), тогда как при pH 2,2 она переводит экзогенные АТФ и АМФ нацело в АДФ (обратная реакция).

Исключительный интерес представляет энергетическая роль фермента аденилаткиназы [8], которая заключается в том, что система адениловых нуклеотидов, находящаяся в динамическом равновесии, характеризуется аденилатным зарядом, который может быть использован как единственная переменная для распределения нуклеотидов. В этом плане интересны данные [9], говорящие о весьма значительном влиянии pH среды на свободную энергию гидролиза АТФ. При pH 4,0 величина гидролиза свободной энергии АТФ весьма мала (немногим выше 6 ккал). При pH 5,0 эта величина остается без изменения. Начиная с pH 6,0 она начинает возрастать и при pH 7,0 равна 7,3 ккал. При увеличении pH до 9,0 величина

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

энергии АТФ резко возрастает. Это можно объяснить увеличением ионизированных форм АТФ.

Наши данные совпадают с этими представлениями, так как в щелочной среде аденилаткиназа весь экзогенный АДФ переводит в АТФ и АМФ. Это связано с увеличением заряда АТФ в результате увеличения ионизации. В кислой среде (pH 2,2) аденилаткиназа все экзогенные молекулы АТФ и АМФ переводит в АДФ в связи с уменьшением ионизации и энергии АТФ, кроме того, аденилаткиназа переносит крайний макроэрг от АТФ к АМФ, образуя две молекулы АДФ.

Влияние фермента аденилаткиназы на систему адениловых нуклеотидов, в прямом и обратном направлениях в зеленых проростках ячменя, мкм/г·свежих листьев. Экспозиция 15 минут

В прямом направлении при pH 8,3 (2 АДФ→АТФ+АМФ). Внесена экзогенная АДФ	
Увеличение АТФ	Опыт 43,81 — контроль 30,63=13,18
Увеличение АМФ	Опыт 56,82 — контроль 47,33=9,49
Увеличение суммы АТФ+АМФ	Увеличение суммы АТФ+АМФ=22,67
Уменьшение АДФ	Опыт 12,31 — контроль 34,80=22,49
В обратном направлении при pH 2,2 (АТФ+АМФ→2 АДФ). Внесены экзогенные АТФ+АМФ	
Уменьшение АТФ	Опыт 16,84 — контроль 31,62=14,78
Уменьшение АМФ	Опыт 39,24 — контроль 48,33=9,09
Уменьшение суммы АТФ+АМФ	Уменьшение суммы АТФ+АМФ=23,87
Увеличение АДФ	Опыт 68,89 — контроль 43,12=25,77

В таблице приведены данные о влиянии фермента аденилаткиназы на содержание адениловых нуклеотидов при внесении экзогенной АДФ (pH 8,3) и суммы экзогенных АТФ+ +АМФ (pH 2,2). При внесении экзогенной АДФ (pH 8,3) под

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

влиянием фермента аденилаткиназы произошла реакция в прямом направлении (2АДФ→АТФ+АМФ), в результате чего сумма синтезированных АТФ+АМФ оказалась практически равной израсходованной на их образование АДФ. Эти данные хорошо согласуются с энергетической ролью фермента аденилаткиназы. Направление данной реакции в сторону образования АТФ при pH 8,3 объясняется тем, что в щелочной среде увеличивается содержание ионизированных молекул АТФ и фермент аденилаткиназа катализирует реакцию в прямом направлении, при котором наблюдается увеличение АТФ.

При внесении суммы экзогенных АТФ+АМФ при pH 2,2 перераспределение адениловых нуклеотидов под воздействием фермента аденилаткиназы протекало в обратном направлении (АТФ+АМФ→2АДФ), и как результат этого, количество синтезированной АДФ оказалось достаточно близким к израсходованной на ее биосинтез суммы АТФ+АМФ. Этот процесс также связывается с аденилатным зарядом и тем, что в кислой среде (pH 2,2), начиная с pH 5,0, замедляется процесс ионизации АТФ, в результате чего фермент аденилаткиназа катализирует реакцию в обратном направлении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тарчевский И. А. Основы фотосинтеза. — М.: Высшая школа, 1977, с. 117.

2. Арнон Д. И. Механизм фотосинтеза. — В кн.: Труды Международного биохимического конгресса, симпозиум VI. М.: Изд-во АН СССР, 1962, с. 208.

3. Диксон М. и Уэбб Э. Ферменты. — М.: Мир, 1966, с. 131, 167.

4. Окунцов М. М., Врублевская К. Г., Зайцева Т. А., Нестеренко Т. Р. Плотникова А. Н. Исследование адениловой системы в растениях. — Научные доклады высшей школы. Биологические науки. 1970. № 4, с. 119.

5. Окунцов М. М., Кесильман Я. Д., Боровик З. И., Лопарева Г. А. Хроматографический анализ адениловых нуклеотидов и аденозина при осаждении их азотнокислым свинцом. — В кн.: Специальный практикум по биохимии и физиологии растений. Калининград, 1981, с. 3.

6. Окунцов М. М., Кесильман Я. Д. Методика определения активности фермента аденилаткиназы. — В кн.: Специальный практикум по биохимии и физиологии растений. Калининград, 1981, с. 5.

7. Окунцов М. М., Аксенова О. Ф., Верхотурова Г. С. и др. Специальный практикум по биохимии и физиологии растений. — Томск: Изд-во Том. ун-та. 1974, с. 4.

8. Atkinson D. E. The Energy Carge of the Adenilate Pool as a Regulatory Parameter. — Interaction with Fudback Modifiers. Biochem 1968, v. 7, p. 4030.

9. Ленинджер А. Биохимия. — М.: Мир, 1974, с. 348.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие 3

Н. С. Мамушина, Л. А. Филиппова, Е. К. Зубкова. О функционировании гликолиза и окислительного пентозофосфатного цикла в ассимилирующей клетке на свету и в темноте 5

Г. С. Верхотурова, Т. П. Астафурова, Л. И. Кудинова. Работа цикла Кребса на свету и некоторые механизмы его регуляции 19

Т. П. Астафурова, Г. С. Верхотурова, О. В. Волкова, О. А. Боровая. К вопросу о функционировании гликолиза в зеленых листьях растений на свету 30

В. М. Иванченко, М. И. Маршакова, С. А. Микульская, Л. В. Обуховская. Влияние митохондрий на кинетику фотохимической активности хлоропластов 37

О. А. Роньжина, Е. Б. Кравченко. Влияние света на систему адениновых нуклеотидов в митохондриях ячменя 48

Т. Д. Романова. Дыхание в процессе зеленения и после действия экстремальной температуры 51

Ю. И. Маслов, И. В. Евдокимова. Подавление дыхания светом у микроводорослей 58

И. В. Терехова, И. И. Чернядьев, Н. Г. Доман. Ферменты цикла трикарбоновых кислот и глиоксилатного шунта цианобактерии спирулина 62

И. М. Магомедов, Зо Ин Бу. К вопросу о регуляции накопления щавелевой кислоты в листьях C_3-растения 67

Т. Р. Пярник, О. Ф. Кээрберг, Х. И. Кээрберг. Выделение CO_2 из листьев фасоли за счет декарбоксилирования C_3- и C_4-кислот, образующихся при фотосинтезе 77

Э. А. Титлянов. Фотосинтез и дыхание в продукционном процессе тропических макроводорослей из рода Sargassum 84

В. Е. Петров, Г. С. Клементьева, Зу Гван Чхол, С. В. Зубова, Н. Л. Лосева. Энергетическая мощность фотодыхания хлореллы в связи с условиями углекислотного обеспечения . . 93

Н. Л. Лосева, С. И. Панкратова, Р. И. Эстрина, В. М. Дьяков, В. Е. Петров. Новый подход к оптимизации энергетического обмена ассимилирующей клетки в связи с действием высоких температур 102

Н. Г. Иванкина, В. А. Новак. Энергетические взаимодействия в системе хлоропласт — плазмалемма 110

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Г. Н. Чупахина, Т. Л. Хлебодарова. Связь светозависимых изменений в системе аскорбиновой кислоты с процессом дыхания 117

А. П. Зотикова, Е. И. Симонова, Н. С. Новикова. Формирование фотосинтетического аппарата хвойных в темноте 121

И. И. Чернядьев, А. С. Образцов, А. Л. Козловских, Н. Г. Доман. Регуляция фотосинтеза и дыхания цитокининами . . 126

О. Н. Ладыгина, Д. А. Закржевский. Влияние дефицита железа на фотосинтез и темновое дыхание листьев гороха 131

Е. Р. Карташова, С. Д. Терешкина. Окислительный пентозофосфатный цикл у семян подсолнечника в условиях кратковременной и длительной гипоксии 136

Е. В. Беляева, М. И. Рыбакова, Н. Г. Доман. Сходство в свойствах рибулозодифосфаткарбоксилазы C_3- и C_4-растений . . . 142

В. Л. Калер, Л. В. Клокоцкая. Возможная связь между долей дыхания в CO_2-газообмене и индукцией механизма концентрирования CO_2 у хлореллы 146

Т. А. Зайцева, Т. Е. Шапиро, К. А. Луговцова, К. Г. Врублевская. О реакции фотовосстановления НАДФ хлоропластами пшеницы в разных условиях освещения 152

Р. И. Лещук, Н. М. Фролова, Л. А. Баталова. Активность глицеральдегидфосфатдегидрогеназы в листьях растений, произрастающих при разных условиях освещения 156

В. М. Постовалова. Фотохимическая активность хлоропластов листьев растений, выращенных на красном и зеленом свету . . 159

Р. А. Карначук, И. Ф. Головацкая, Н. Н. Протасова. Рост и фотосинтез листа серпухи, адаптированной к спектральному составу света 163

И. Ф. Головацкая, Р. А. Карначук, П. В. Власов. Гормональная регуляция роста в онтогенезе листа растений на свету . . 169

В. Г. Ладыгин, С. И. Аллахвердиев, А. Г. Четвериков. Исследование величины фотосинтетической единицы и числа реакционных центров у мутантов Chlamydomonas с редукцией светособирающего комплекса 174

В. Г. Ладыгин, Г. Н. Ширшикова, Г. А. Семенова. Состав, организация и структурная локализация хлорофилл-белковых комплексов фотосистемы I и фотосистемы II 180

О. Н. Ладыгина, Д. А. Закржевский. Изменение величины фотосинтетической единицы в процессе онтогенеза гороха в условиях дефицита железа 188

Г. Н. Ширшикова. Локализация виолаксантинового цикла в электрон-транспортной цепи хлоропластов 194

А. С. Чунаев, Н. Г. Аверина, А. Бошетти, Е. М. Чекунова, Н. В. Шалыго. Анализ состава фотосинтетических пигментов и их биосинтетических предшественников у двух пигментных мутантов Chlamydomonas reinhardii 199

М. М. Окунцов. Аденилаткиназный путь фосфорилирования у растений 208

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

ВОПРОСЫ ВЗАИМОСВЯЗИ ФОТОСИНТЕЗА И ДЫХАНИЯ

Редактор К. Г. Шилько
Художественный редактор Р. М. Вазиев
Технический редактор Р. А. Прошенкина
Корректор Т. В. Зибарева
ИБ 2003

Сдано в набор 20.05.87 г. Подписано в печать 24.08.88 г. КЗ02065. Формат 60×84 1/16. Бумага типографская № 3. Гарнитура литературная. Печать высокая. Печ. л. 14,25. Усл. печ. л. 13,25. Уч.-изд. л. 12,4. Тираж 500 экз. Заказ 15. Цена 1 р. 90 к.

Издательство ТГУ, 634029, Томск, ул. Никитина, 4.
Тип. «Красноярский рабочий», 660607, г. Красноярск, пр. Мира, 91.

14*

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

РЕФЕРАТЫ НА ОПУБЛИКОВАННЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.132; 581,12

Мамушина Н. С., Филиппова Л. А., Зубкова Е. К. **О функционировании гликолиза и окислительного пентозофосфатного цикла в ассимилирующей клетке на свету и в темноте.**— В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 5—18.

В работе дана история открытия локализации обоих путей окисления глюкозы в хлоропластах, освящены современные представления о механизмах их регуляции на свету в хлоропластах и в цитоплазме. Показано, что в зрелых клетках хлореллы или листа отмечается ингибирование обоих этапов дыхания на свету, в то время как в клетках с интенсивной метаболической нагрузкой работа гликолиза и ОПФЦ не ограничена. Высказывается идея, что механизмом ингибирования гликолиза и ОПФЦ на свету является конкуренция за АДФ, $P_н$ и НАДФ в цитоплазме между энергогенерирующими этапами дыхания и фотосинтезом. В случае высокой скорости утилизации АТФ, которая может иметь место при интенсивном метаболизме клетки (рост, отток ассимилятов), ингибирования гликолиза и ОПФЦ на свету не происходит.

Библ. 39, табл. 2, ил. 5.

УДК 581.12

Верхотурова Г. С., Астафурова Т. П., Кудинова Л. И. **Работа цикла Кребса на свету и некоторые механизмы его регуляции.** — В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 19—29.

В статье приводятся обзорные материалы и экспериментальные данные авторов по действию света на реакции дыхательного метаболизма, связанного с циклом Кребса. Рассматривается работа ключевых ферментов цикла на свету, его физиологическая роль. Показана активность под действием света НАД- и НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ и НАД-малатдегидрогеназы, связанных с фракцией клеточных структур, обогащенной митохондриями. Обсуждаются возможные механизмы регуляции цикла Кребса различными метаболитами, образующимися в процессе фотосинтеза. На основании данных по активности малатдегидрогеназ с различной коферментной специфичностью, определяемых в отдельных клеточных компартментах, авторами придается особая роль малату как метаболиту, поставляющему в цикл углеродные скелеты.

Библ. 40, табл. 2, ил. 3.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

УДК 581.12/13

Астафурова Т. П., Верхотурова Г. С., Волкова О.В., Боровая О. А. **К вопросу о функционировании гликолиза в зеленых листьях растений на свету.** — В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 30—36.

Приводятся данные о метаболизме ди- и трикарбоновых кислот и пирувата при введении в листья растений экзогенных субстратов, кофакторов и ингибиторов, а также в различных зонах роста листа при переходе от гетеротрофного питания к автотрофному. Обсуждается возможность функционирования реакций гликолиза в зеленых листьях растений на свету.

Библ. 14, табл. 4, ил. 1.

УДК 576.3+581.1

Иванченко В. М., Маршакова М. И., Микульская С. А., Обуховская Л. В. **Влияние митохондрий на кинетику фотохимической активности хлоропластов.** — В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 37—47.

Митохондрии, изолированные из корней проростков гороха и ячменя, а также этиолированных листьев ячменя, оказывают ингибирующее влияние на фотохимическую активность хлоропластов, изолированных из листьев тех же проростков гороха или зеленых листьев проростков ячменя. Такое действие проявляется преимущественно в быстром выходе исследуемых реакций на фотостационарный уровень задолго до исчерпания субстрата. Показано, что водорастворимая фракция суммарных белков из митохондрий влияет на кинетику фотохимических реакций хлоропластов идентично целым митохондриям. Высказано предположение, что взаимодействие хлоропластов и митохондрий in vitro реализуется с участием водорастворимых полипептидов. Обсуждается возможность такого взаимодействия in vivo.

Библ. 6, ил. 10.

УДК 581.1 : 633.11

Роньжина О. А., Кравченко Е. Б. **Влияние света на систему адениловых нуклеотидов в митохондриях ячменя.** — В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 48—50.

Исследовалась адениловая система в митохондриях ячменя в зависимости от света. Показано, что пул аденилатов в митохондриях сдвигается светом. Уже при кратковременном освещении растений в течение 20 и 60 мин уровень аденилатов, особенно АТФ, в митохондриях значительно возрастает. При более длительном освещении растений различия по сравнению с темновым контролем менее четко выражены, вероятно, в результате активного использования энергии АТФ на нужды клетки. Высказывается предположение, что АТФ на свету может синтезироваться в самих митохондриях.

Библ. 7, табл. 1.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

УДК 581.12

Романова Т. Д. **Дыхание в процессе зеленения и после действия экстремальной температуры.** — В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 51—57.

Рассматривается взаимоотношение фотосинтеза и дыхания по мере формирования фотосинтетического аппарата (зеленение). В этиолированных растениях и на ранних стадиях зеленения (3—4 ч) основная нагрузка в обеспечении клетки энергией приходится на темновое дыхание. В это время наблюдается довольно сильный гликолиз и высокая активность основных звеньев ЭТЦ митохондрий. Действие высокой температуры, подавляющей фотосинтез, приводит к усилению дыхания. При этом усиливается гликолиз, подавляется окисление НАД-зависимых субстратов и усиливается поток электронов по основной цитохромной цепи, связанной с образованием энергии и чувствительной к цианиду. Обсуждаются возможности взаимозаменяемости основных источников энергии в зависимости от физиологического состояния и экологической обстановки.

Библ. 13, табл. 2, ил. 2.

УДК 581.12

Маслов Ю. И., Евдокимова И. В. **Подавление дыхания светом у микроводорослей.** — В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 58—61.

В присутствии диурона в концентрации, полностью подавляющей фотосинтетическое выделение кислорода, свет частично подавляет дыхание цианобактерий (р. Anabaena) и эвглены. Наблюдаемый эффект объясняется взаимодействием дыхательной и фотосинтетической цепей переноса электронов.

Библ. 7, ил. 2.

УДК 581.12

Терехова И. В., Чернядьев И. И., Доман Н. Г. **Ферменты цикла трикарбоновых кислот и глиоксилатного шунта цианобактерии спирулина.** — В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 62—66.

Представлены данные по определению удельной активности и некоторых особенностей работы ряда ферментов ЦТК и глиоксилатного шунта гормогониевой цианобактерии.

Установлено, что цикл трикарбоновых кислот спирулины разомкнут на уровне α-кетоглутаратдегидрогеназы и играет ограниченную роль в генерации энергии, выполняя в основном биосинтетические функции. Окислительная ветвь ЦТК ведет к двум конечным продуктам — α-кетоглутарату и через глиоксилатный шунт и сукцинил-КоА-синтетазу — к сукцинил-КоА. Функционирование другой ветви ЦТК тесно связано с действием «малик»-энзимов и фосфоэнолпируват-карбоксилазы и определяется требованиями биосинтеза.

Библ. 11, табл. 1.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

УДК 581.12

Магомедов И. М., Зо Ин Бу. **К вопросу о регуляции накопления щавелевой кислоты в листьях C_3-растения.** — В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 67—76.

Рассмотрены вопросы образования и накопления щавелевой кислоты в листьях C_3-растений (шпинат и столовая свекла) на свету и в темноте. Показано, что форма азота в питательной среде является мощным регулятором накопления оксалата в листьях. Предложена схема, где обобщены возможные пути метаболизма оксалата в листьях C_3-растений.

Библ. 11, табл. 2, ил. 4.

УДК 581.138.8

Пярник Т. Р., Кээрберг О. Ф., Кээрберг Х. И. **Выделение CO_2 из листьев фасоли за счет декарбоксилирования C_3- и C_4-кислот, образующихся при фотосинтезе.** — В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 77—83.

Для введения метки в C_3- и C_4-соединения листья фасоли экспонировали в темноте при насыщающей концентрации $^{14}CO_2$ и низкой концентрации O_2 (1,5%). Показано, что эндогенные C_3- и C_4-соединения могут быть источниками CO_2 в первые минуты после выключения света. На насыщающем свету выделение CO_2 из C_3-кислот подавляется из-за ингибирования синтеза пирувата из фосфоенолпирувата. В присутствии CO_2 декарбоксилирование C_4-кислот протекает интенсивно как в темноте, так и на свету. В среде без CO_2 на сильном свету выделение $^{14}CO_2$ из C_4-кислот прекращается. Предполагается, что декарбоксилирование C_3 и C_4-кислот регулируется соотношениями АДФ/АТФ и НАДФ/НАДФ.H_2 в клетке.

Библ. 10, табл. 2.

УДК 581.12/13

Титлянов Э. А. **Фотосинтез и дыхание в продукционном процессе тропических макроводорослей из рода Sargassum.** — В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 84—92.

Изучена дневная динамика изменения скоростей истинного фотосинтеза и темнового дыхания у различно освещенных частей талломов саргассовых водорослей в их естественных зарослях в заливе Бенгой и близ о. Тху в Южно-Китайском море. Рассчитаны продукционные показатели разных видов саргассов, выделены наиболее продуктивные виды. Показано, что в продукционном процессе проявляется прямая зависимость фотосинтетического и дыхательного метаболизмов. Изменения скоростей этих двух процессов в зависимости от вида водоросли, интенсивности освещения различных частей таллома или времени дня в преобладающем большинстве опытов однонаправленны. Обсуждаются возможные механизмы взаимодействия фотосинтетического и дыхательного процессов.

Библ. 10, ил. 1, табл. 1.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

УДК 581.132

Петров В. Е., Клементьева Г. С., Зу Гван Чхол, Зубова С. В., Лосева Н. Л. **Энергетическая мощность фотодыхания хлореллы в связи с условиями углекислотного обеспечения.** — В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 93—101.

Исследована роль фотометаболизма гликолата в энергетическом балансе ассимилирующей клетки и эффекте несоответствия между энерго- и газообменом при фотосинтезе хлореллы в условиях углекислотного дефицита. Показано, что независимо от условий углекислотного обеспечения ни торможение фотодыхания введением гидразида изоникотиновой кислоты, ни его стимуляция экзогенным гликолатом существенного влияния на величину эффекта несоответствия не оказали. Обсуждаются возможные механизмы проявления эффекта несоответствия между энерго- и газообменом у растений.

Библ. 17, ил. 3.

УДК 581.132+581.192

Лосева Н. Л., Панкратова С. И., Эстрина Р. И., Дьяков В. М., Петров В. Е. **Новый подход к оптимизации энергетического обмена ассимилирующей клетки в связи с действием высоких температур.** — В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 102—109.

Объектом исследования служили проростки яровой пшеницы, кинетику тепловыделения которых учитывали с помощью дифференциального микрокалориметра ДАК-1-1А. Для оптимизации энергетического обмена растений при тепловом стрессе в широком диапазоне концентраций (0,15—0,01%) использовали мивал, который является регулятором роста. При экстремальной температуре мивал оказывает протекторное действие на растение, происходит стабилизация тепловыделения. Полученные результаты показывают, что он снижает ингибирующий эффект диурона на электронтранспортную цепь фотосинтеза и почти вдвое увеличивает биосинтез полярных глицеролипидов.

Библ. 7, табл. 2, ил. 5.

УДК 577.352.5 : 577.3.05

Иванкина Н. Г., Новак В. А. **Энергетические взаимодействия в системе хлоропласт — плазмалемма.** — В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 110—116.

На примере светоиндуцированной гиперполяризации плазмалеммы рассматривается участие окислительно-восстановительных реакций, локализованных в плазмалемме, в регуляторно-энергетических взаимодействиях клетки. Предполагается, что окисление НАД(Ф)Н в плазмалеммной редоксистеме может выполнять в клетке роль псевдоцикла, регулируя соотношение АТФ/НАДФН в хлоропластах.

Библ. 17, табл. 1, ил. 2.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

УДК 581.12

Чупахина Г. Н., Хлебодарова Т. Л. **Связь светозависимых изменений в системе аскорбиновой кислоты с процессом дыхания.** — В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 117—120.

Исследовалась возможность участия пероксидазы в светозависимых изменениях системы аскорбиновой кислоты. Показана световая стимуляция ферментативной активности в 7—10-дневных зеленых, этиолированных и альбиносных проростках ячменя (интенсивность света 4,4 тыс. эрг/см^2·с; экспозиция 2 ч). Последние имели самый высокий уровень пероксидазы. Зеленый свет (480—600 нм) повышал, синий (440—520 нм) — снижал активность фермента у всех типов проростков, красный (620—740 нм) — активировал пероксидазу только в этиолированных листьях.

Сделан вывод о фоторецепторной роли молекулы пероксидазы, тонкая регуляция активности которой осуществляется светом определенного спектрального состава. Светозависимые изменения в системе аскорбиновой кислоты объяснены связанным с дыханием новообразованием аскорбата, повышающим пул его, несмотря на одновременную активацию светом окисляющих ферментов.

Библ. 9, табл. 2.

УДК 581.132

Зотикова А. П., Симонова Е. И., Новикова Н. С. **Формирование фотосинтетического аппарата хвойных в темноте.**— В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та. 1988, с. 121—125.

Исследованы особенности формирования пигментов, их спектральные свойства и развитие активности фотосистем I и II у 14-дневных проростков сосны и кедра, выращенных в темноте. Анализ вторых производных спектров поглощения хлорофилла показал, что без участия света у изученных проростков образуются все пигмент-белковые комплексы, характерные для покрытосеменных растений, развивающихся в естественных условиях освещения. Исследованием реакций фотовосстановления НАДФ и феррицианида изолированными хлоропластами установлено лимитирование скорости транспорта электронов на уровне фотосистемы II. Быстрая стимуляция электрон-транспортных реакций кратковременной световой экспозицией или 1,5-дифенилкарбазидом предполагает слабое развитие в темноте у сосны и кедра системы разложения воды.

Библ. 5, табл. 1, ил. 2.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

УДК 581.12

Чернядьев И. И., Образцов А. С., Козловских А. Л., Доман Н. Г. **Регуляция фотосинтеза и дыхания цитокининами.** — В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 126—130.

В листьях многолетних злаков первого года жизни овсяницы луговой и овсяницы тростниковидной соединения с цитокининовой активностью тидиазурон, картолин и 6-бензиламинопурин увеличивал образование хлорофиллов a и b и каротиноидов, интенсивность фотосинтетической ассимиляции углекислоты и темнового дыхания и активность ферментов восстановительного пентозофосфатного цикла рибулозодифосфаткарбоксилазы и НАДФ-глицеральдегидфосфатдегидрогеназы.

Библ. 6, табл.

УДК 581.132

Ладыгина О. Н., Закржевский Д. А. **Влияние дефицита железа на фотосинтез и темновое дыхание листьев гороха.** — В кн: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 131—135.

Работа выполнена на листьях гороха 25—30-суточных растений. Спектрофотометрическим методом установлено, что в условиях дефицита железа содержание пигментов в каждом последующем ярусе листьев прогрессивно уменьшается. Дыхание также уменьшается, хотя и в меньшей степени. На основании низкотемпературных спектров флуоресценции хлорофилла можно заключить, что во всех листьях, несмотря на убывающее количество, сохраняются пигмент-белковые комплексы, что предполагает отсутствие специфичности в механизме повреждающего действия дефицита железа.

Библ. 5, табл. 1, ил. 3.

УДК 581.12

Карташова Е. Р., Терешкина С. Д. **Окислительный пентозофосфатный цикл у семян подсолнечника в условиях кратковременной и длительной гипоксии.** — В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 136—141.

Изучали интенсивность дыхания семян подсолнечника по поглощению кислорода амперометрическим методом в условиях гипоксии и при вентиляции воздухом. Участие в дыхании различных окислительных путей установили, используя ингибиторы дыхания и определяя активность основных ферментных систем. В результате проведенной работы показано, что жизнеспособность семян при длительном хранении в РГС выше, чем при хранении в воздушной среде за счет накопления восстановительного пула НАДФ H_2 и гормона роста ауксина.

Табл. 2, ил. 3.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

УДК 581.12

Беляева Е. В., Рыбакова М. И., Доман Н. Г. **Сходство в свойствах рибулозодифосфаткарбоксилазы C_3- и C_4-растений.**— В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 142—145.

Гомогенные рибулозодифосфаткарбоксилазы из листьев C_4-растения (кукурузы) и C_3-растений (бобы и пшеница озимых сортов) не отличаются по размеру молекул, субъединичному составу и другим свойствам. Наибольшие различия наблюдаются по активности и содержанию фермента в листьях, которые определяются генотипом, а также зависят от физиологического состояния растений.

Библ. 11.

УДК 581.132

Калер В. Л., Клокоцкая Л. В. **Возможная связь между долей дыхания в CO_2-газообмене и индукцией механизма концентрирования CO_2 у хлореллы.** — В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 146—151.

Обнаружена тесная корреляция между долей дыхания в CO_2-газообмене клеток хлореллы и угловым коэффициентом начального участка углекислотной кривой фотосинтеза. В условиях, когда включаются механизмы индукции карбоангидразной системы (высокая освещенность и температура, низкие концентрации CO_2), наблюдается симбатная корреляция. В неиндуцибельных условиях (предынкубация в темноте) корреляция антибатная. Предполагается (в качестве рабочей гипотезы) существование функциональной связи между индукцией механизмов концентрирования CO_2 у хлореллы и митохондриальным дыханием либо реакциями декарбоксилирования органических кислот.

Библ. 3, ил. 1.

УДК 581.132

Зайцева Т. А., Шапиро Т. Е., Луговцева К. А., Врублевская К. Г. **О реакции фотовосстановления НАДФ хлоропластами пшеницы в разных условиях освещения.**— В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 152—155.

Исследовали потенциальные способности хлоропластов к фотовосстановлению НАДФ на ранних стадиях зеленения этиолированных проростков пшеницы на свету разного спектрального состава. Показано, что скорость электрон-транспортных реакций изменяется неоднозначно в зависимости от степени сформированности фотосинтетического аппарата и качества света. Высокая функциональная активность отмечена для хлоропластов с синего света. Зеленый свет наряду с синим и красным формирует хлоропласты, обладающие способностью к восстановлению НАДФ по всей ЭТЦ с достаточно высокой скоростью.

Библ. 5, табл. 1.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

УДК 581.132

Лещук Р. И., Фролова Н. М., Баталова Л. А. **Активность глицеральдегидфосфатдегидрогеназы в листьях растений, произрастающих при разных условиях освещения.**— В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та. 1988, с. 156—158.

В работе исследовали влияние разных условий естественного освещения на активность НАДФH_2- и НАДH_2-зависимых форм ГАФДГ в растениях овса и гороха в процессе их роста. В опытах использовали листья 7-, 14-, 21-дневных растений, которые выращивали при естественном освещении и затенении. Установлено, что величина активности ГАФДГ у растений, выращенных в разных световых режимах, зависит от видовых особенностей, возраста и условий освещения.

Библ. 7, табл. 2, ил. 2.

УДК 581.132

Постовалова В. М. **Фотохимическая активность хлоропластов листьев растений, выращенных на красном и зеленом свету.** — В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 159—162.

Исследования фотохимической активности хлоропластов, выделенных из листьев растений Avena sativa L., Zea mays L., Serratula coronata L., выращенных на красном и зеленом свету, показали, что ФАХ определяется качеством света, а также возрастом листа.

Библ. 8, табл. 2, ил. 1.

УДК 581.132

Карначук Р. А., Головацкая И. Ф., Протасова Н. Н. **Рост и фотосинтез листа серпухи, адаптированной к спектральному составу света.** — В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 163—168.

Исследовали взаимосвязь ростовых и фотосинтетических реакций в листьях серпухи венценосной, адаптированной к свету разного спектрального состава. Репликация хлоропластов мало зависит от качества света данной интенсивности, наиболее зависимы процессы деления и растяжения клеток. Красный свет создает оптимальные условия для роста листьев. На синем свету увеличивается число клеток в единице поверхности листа, следовательно, повышается содержание хлоропластов. Это является одной из причин более высокой интенсивности фотосинтеза в расчете на единицу поверхности листа. Зеленый свет тормозит ростовые реакции, что ведет к снижению уровня фотосинтеза и продуктивности.

Библ. 4, табл. 1, ил. 4.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

УДК 581.192+581.193

Головацкая И. Ф., Карначук Р. А., Власов П. В. **Гормональная регуляция роста в онтогенезе листа растений на свету.** — В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 169—173.

В работе обсуждается влияние спектрального состава света на активность фитогормонов листа лихниса кальцедонского и левзеи сафлоровидной. Показаны особенности действия разных участков спектра фотосинтетически активной радиации на состояние гормональной системы растений, меняющей соотношение стимуляторов и ингибиторов роста и скорость ростовых процессов в онтогенезе листа.

Библ. 7, ил. 2.

УДК 581.132 : 582.264.12

Ладыгин В. Г., Аллахвердиев С. И., Четвериков А. Г. **Исследование величины фотосинтетической единицы и числа реакционных центров у мутантов Chlamydomonas с редукцией светособирающего комплекса.** — В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 174—179.

Исследование проведено на клетках хламидомонады дикого типа и мутантов с потерей части (мутант С-48) или всего (мутант СС-107) светособирающего комплекса или содержащих только фотосистему II: АСС-66, АСС-98, АСС-100, АСС-238. Установлено, что потеря части или всего светособирающего комплекса практически не изменяет числа реакционных центров как фотосистемы I, так и фотосистемы II. Кроме того, генетическое нарушение одной из фотосистем, существенно не сказывается на содержании другой. Показано, что генетическое нарушение светособирающего комплекса не должно изменять фотосинтетическую активность хлоропластов и потенциальную продуктивность растений в оптимальных для каждой группы штаммов условиях.

Библ. 6, табл. 2, ил. 1.

УДК 577.355 : 581.174.1.035.4

Ладыгин В. Г., Ширшикова Г. Н., Семенова Г. А. **Состав, организация и структурная локализация хлорофилл-белковых комплексов фотосистемы I и фотосистемы II.** — В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 180—187.

Исследование проведено на клетках дикого типа и мутантах зеленой водоросли хламидомонады. Спектральными и биохимическими методами установлено, что в мембранах хлоропластов содержится четыре хлорофилл-белковых комплекса: фотосистемы I, фотосистемы II, светособирающий Хл.-а/b-белок, светособирающий Хл.-а-белок. Фотосистема II образует агрегат с Хл.-а/b-белком, который локализуется на гидрофобной поверхности внутренней половины мембраны со стороны внутритилакоидного пространства и выявляется на сколах в виде 160 Å субчастиц. Фотосистема I, объединяясь с Хл.-а-белком, формирует агрегат, который локализуется на внешней половине мембраны тилакоида со стороны стромы хлоропласта и выявляется на гидрофобной поверхности скола в виде 140 Å субчастиц.

Библ. 9, табл. 1, ил. 3.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

УДК 577.355 : 581.132

Ладыгина О. Н., Закржевский Д. А. **Изменение величины фотосинтетической единицы в процессе онтогенеза гороха в условиях дефицита железа.** — В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 188—193.

Исследование проводили на листьях гороха, выращенного в климатической камере в водной культуре в течение 25—30 дней. Показано, что число реакционных центров фотосистем в условиях дефицита железа постепенно уменьшается в расчете на сырую массу или площадь листа. В то же время на единицу хлорофилла число центров увеличивается, что обусловливает уменьшение фотосинтетической единицы в процессе онтогенеза в результате преимущественной редукции светособирающего комплекса. Снижение числа реакционных центров фотосистем у хлорозных листьев является причиной падения их фотосинтетической активности и продуктивности растений.

Библ. 4, табл. 1, ил. 2.

УДК 581.132 : 581.174.1

Ширшикова Г. Н. **Локализация виолаксантинового цикла в электрон-транспортной цепи хлоропластов.** — В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 194—198.

Работа выполнена на клетках дикого типа и двух мутантов: А-66 без фотосистемы I и АС-864 без фотосистемы II и хлорофилла b. Методом тонкослойной хроматографии на стекле 20×20 см установлено, что для превращения виолаксантина вначале в антераксантин, а затем в зеаксантин на свету не требуется функционирования фотосистемы II, что исключает возможность участия этих каротиноидов в механизме фотоокисления воды и выделения кислорода. Усиление процесса превращения виолаксантина в зеаксантин при функционировании только ФС I предполагает локализацию виолаксантинового цикла вблизи этой фотосистемы.

Библ. 8, табл. 1, ил. 2.

УДК 577 : 575.25

Чунаев А. С., Аверина Н. Г., Бошетти А., Чекунова Е. М., Шалыго Н. В. **Анализ состава фотосинтетических пигментов и их биосинтетических предшественников у двух пигментных мутантов Chlamydomonas reinhardii.** — В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 199—207.

У двух мутантов Chlamydomonas reinhardii, несущих мутантные аллели несцепленных ядерных генов, и у исходного, нормально пигментированного штамма, исследован состав каротиноидов и хлорофиллов и некоторых их биосинтетических предшественников. У мутанта pg-113 обнаружено сниженное содержание хлорофилла b и неоксантина, снижение содержания протохлорофиллида и магний-протопорфирин IX монометилового эфира. В противоположность этому для мутанта pg-101 характерно отсутствие лороксантина, лютеина и α-каротина. Обсуждается природа блока у исследованных мутантов.

Библ. 16, табл. 2, ил. 1.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

УДК 581.1.633.11

Окунцов М. М. **Аденилаткиназный путь фосфорилирования у растений.**— В кн.: Вопросы взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1988, с. 208—212.

Изучался способ образования АТФ в растениях под влиянием фермента аденилаткиназы, который катализирует реакцию 2АДФ⇄АТФ+АМФ. Установлено, что при pH 8,3 реакция протекает в прямом направлении (2АДФ→АТФ+АМФ), при pH 2,2 — в обратном. Биосинтез АТФ в прямом направлении связывается с энергетической ролью этого фермента и адениловым зарядом. В щелочной среде происходит увеличение свободной энергии АТФ за счет увеличения ионизированных молекул.

Библ. 9, табл. 1.

Digital Library (repository)
of Tomsk State University
http://vital.lib.tsu.ru

1 р. 90 к.

1-68300

Digital Library (Repository) of Tomsk State University http://vital.lib.tsu.ru

Томский госуниверситет 1878

Научная библиотека 00391031