

<https://doi.org/10.3176/biol.1970.1.01>

ЭДА ВЯРК, О. КЭЭРБЕРГ, ХИЛЛЕ КЭЭРБЕРГ, Т. ПЯРНИК

## ИССЛЕДОВАНИЕ ГЛИКОЛАТНОГО ПУТИ АССИМИЛЯЦИИ УГЛЕРОДА В ЛИСТЬЯХ ФАСОЛИ

Образование различных органических веществ в процессе фотосинтеза происходит разнообразными путями биосинтеза. Среди них важное место занимает гликолатный путь превращения углерода. Отдельные реакции этого пути и их последовательность в последнее время исследовали многие авторы (Tolbert, Cohen, 1953; Zelitch, 1959; Wang, Waygood, 1962; Rabson и др., 1962; Mifflin и др., 1966; Колесников, 1968). В результате этих работ установлено, что гликолевая кислота, образующаяся при фотосинтезе из углекислого газа, окисляется под действием оксидазы гликолевой кислоты в глиоксилевую кислоту (рис. 1). Последняя может окисляться до  $\text{CO}_2$  или аминироваться с образованием глицина. В присутствии метилтетрагидрофолиевой кислоты глицин легко превращается в серин, так как в растениях равновесие реакции глицин  $\rightleftharpoons$  серин сдвинуто в сторону образования серина (Cossins, Sinha, 1966). При дезаминировании серина образуются оксипировиноградная и глицериновая кислоты, которые являются исходными веществами для синтеза углеводов. Е. Хименез и соавторы (Jimenez и др., 1962) предполагают, что синтез гексоз на базе этих трехуглеродных соединений протекает по пути обратного гликолиза.

Реакции гликолатного пути обнаружены в листьях ряда высших растений: пшеницы (Wang, Waygood, 1962; Rabson и др., 1962; Wang, Burris, 1963), сои (Rabson и др., 1962), гороха (Mifflin и др., 1966) и табака (Zelitch, 1959; Hess, Tolbert, 1966). В нашей предыдущей работе (Кээрберг и др., 1968), в которой исследовалось действие интенсивности света на распределение углерода в продуктах фотосинтеза у фасоли, высказано предположение о том, что гликолатный путь функционирует и в листьях этой культуры. Для обоснования этого предположения и выводов, сделанных на основе этого, была проведена серия опытов по изучению гликолатного пути в листьях фасоли, где исследовалась кинетика включения  $^{14}\text{C}$  в предполагаемые промежуточные продукты гликолатного пути при экспо-

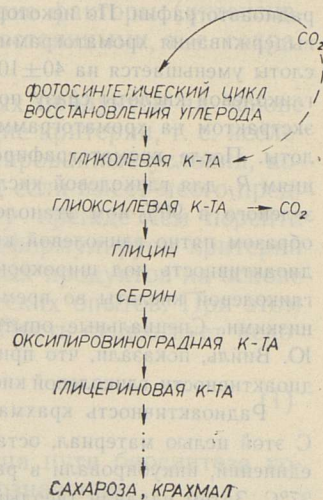


Рис. 1. Гликолатный путь ассимиляции углерода.

зиции листьев в среде, содержащей  $^{14}\text{CO}_2$ , и при выдерживании листьев после экспозиции в среде с  $^{12}\text{CO}_2$ . Для определения последовательности образования продуктов математически были разработаны соответствующие критерии. Исследовались также метаболизм экзогенного серина-3- $^{14}\text{C}$  в листьях фасоли и действие бисульфита натрия (ингибитора оксидазы гликолевой кислоты) на включение метки из  $^{14}\text{CO}_2$  в гликолевую кислоту. Для сравнения были проведены некоторые опыты с листьями табака, в которых гликолатный путь уже ранее установлен (Zelitch, 1959; Hess, Tolbert, 1966).

### Материал и методика

**Опыты с радиоактивным углекислым газом.** В опытах использовались 14-дневные растения фасоли (*Phaseolus vulgaris*, сорт 'Saxa') и 2-месячные растения табака (*Nicotiana tabacum*, сорт 'White Burley'), выращенные под люминесцентными лампами. Из первых после семядолей листьев фасоли и зрелых листьев табака (длиной 16—18 см) вырезали диски диаметром 24 мм, которые экспонировались в камере с радиоактивным углекислым газом (Пярник, Кээрберг, 1966). Концентрация  $\text{CO}_2$  в камере составляла 0,03—0,04%, удельная радиоактивность углекислого газа — 600 мкюри/л. Для установления стационарного состояния фотосинтеза диски из листьев подвергались 5-минутному предварительному освещению вне камеры. В каждом варианте опыта экспонировалось 6 дисков, вырезанных из разных листьев.

После окончания экспозиции диски фиксировали в кипящем 80%-ном этаноле. Меченые продукты фотосинтеза экстрагировали и разделяли по методу, описанному ранее (Вярк и др., 1968).

Радиоактивность гликолевой кислоты определяли по несколько модифицированному методу. То обстоятельство, что гликолевая кислота — летучее соединение, вызывает довольно существенные ее потери в процессе хроматографирования и особенно во время радиоавтографии. По некоторым данным (Tolbert, Zill, 1956), в течение двухнедельного выдерживания хроматограмм на рентгеновской пленке радиоактивность гликолевой кислоты уменьшается на  $40 \pm 10\%$ . Чтобы избежать этого, мы определяли радиоактивность гликолевой кислоты сразу после хроматографирования, для чего вместе с исследуемым экстрактом на хроматограммы наносили около 3 мкмоль немеченой гликолевой кислоты. После хроматографирования область хроматограммы, соответствующую значению  $R_f$  для гликолевой кислоты, обрабатывали 0,05%-ным раствором бромкрезолового зеленого в 90%-ном этаноле, приведенном к щелочной реакции. Проявленное таким образом пятно гликолевой кислоты вырезали из хроматограммы и определяли его радиоактивность под широкооконным торцовым счетчиком СБТ-10. Что касается потерь гликолевой кислоты во время хроматографирования, то они оказались относительно низкими. Специальные опыты с гликолатом-1- $^{14}\text{C}$ , проведенные в нашей лаборатории Ю. Вийль, показали, что при выбранных нами системах растворителей уменьшение радиоактивности гликолевой кислоты в процессе хроматографирования составляет  $10 \div 20\%$ .

Радиоактивность крахмала определяли после его ферментативного гидролиза. С этой целью материал, оставшийся после экстрагирования растворимых в этаноле соединений, инкубировали в растворе амилазы (рН 6,7) в течение 48 ч при температуре 37°C. Затем удаляли твердый остаток и определяли радиоактивность гидролизата. Учитывая высокую специфичность амилазы, по радиоактивности гидролизата можно судить о содержании  $^{14}\text{C}$  в крахмале.

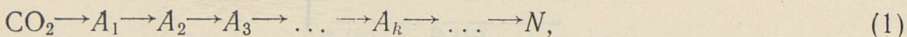
**Опыты с ингибитором оксидазы гликолевой кислоты.** В качестве ингибитора оксидазы гликолевой кислоты использовали 0,1 М раствор бисульфита натрия. Отрезанные листья помещали черешками в раствор ингибитора (опыт) или в воду (контроль) и выдерживали в течение 2 ч на свету. После этого из листьев вырезали диски диаметром 24 мм, которые экспонировали в течение 3 мин в среде с  $^{14}\text{CO}_2$ . После окончания экспозиции диски фиксировали и определяли радиоактивность гликолевой кислоты (см. выше).

**Опыты с серином-3-<sup>14</sup>C.** (Серин-3-<sup>14</sup>C, так же как и ингибитор, вводили в листья транспирационным током. Для этого отрезанные листья помещали черешками в 0,05 М раствор серина-3-<sup>14</sup>C (удельная радиоактивность 0,19 мкюри/ммоль) и выдерживали в течение 2 ч в темноте. После этого листья вынимали из раствора серина, помещали черешками в воду и освещали в течение определенного промежутка времени (0, 15, 30, 45 мин). Продукты метаболизма серина-3-<sup>14</sup>C определяли таким же образом, как продукты фотосинтеза в среде с <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>.

## Результаты и обсуждение

**Кинетические опыты.** Одним из способов определения последовательности промежуточных продуктов какой-либо цепи реакций, получившей начало от цикла фотосинтетического восстановления углерода и приводящей к образованию конечных продуктов фотосинтеза, является исследование кинетики включения радиоактивного углерода в эти соединения. При эксперименте это означает, что листья в состоянии стационарного фотосинтеза экспонируются в течение разных промежутков времени в среде с радиоактивным углекислым газом и определяется количество <sup>14</sup>C в промежуточных продуктах исследуемого пути синтеза. При исследовании химизма фотосинтетической ассимиляции CO<sub>2</sub> часто применяется и так наз. метод глотка. Он заключается в том, что после кратковременного фотосинтеза в среде с <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> («глоток») листья выдерживают в среде с <sup>12</sup>CO<sub>2</sub> и наблюдают за кинетикой перераспределения фиксированного во время «глотка» <sup>14</sup>C между отдельными продуктами фотосинтеза. При этом опыт можно проводить таким образом, что при переходе от радиоактивной в нерадиоактивную среду внешние факторы (интенсивность света, концентрация CO<sub>2</sub> и т. д.) остаются постоянными, т. е. сохраняется стационарное состояние фотосинтеза.

Для оценки последовательности промежуточных продуктов на основе описанных выше опытов требуются соответствующие критерии, т. е. исследователю необходимы некоторые заранее сформулированные условия, которым должны соответствовать результаты опытов, если имеет место предполагаемая последовательность реакций. Поэтому прежде чем перейти к изложению экспериментального материала, мы сформулируем критерии для определения последовательности промежуточных продуктов на основе результатов описанных выше двух типов кинетических опытов. При этом мы исходили из следующих общих соображений. Пусть существует некоторая последовательность реакций:



где

$A_1, A_2, A_3, \dots, A_k, \dots$  — промежуточные продукты на пути биосинтеза конечного продукта  $N$  из CO<sub>2</sub>. Введем следующие обозначения:

$c_1, c_2, c_3, \dots, c_k, \dots$  — величины стационарных фондов промежуточных продуктов  $A_1, A_2, A_3, \dots, A_k, \dots$ ;

$P_1(t), P_2(t), P_3(t), \dots, P_k(t), \dots$  — радиоактивность промежуточных продуктов  $A_1, A_2, A_3, \dots, A_k, \dots$  при продолжительности экспозиции  $t$ ;

$x_1(t), x_2(t), x_3(t), \dots, x_k(t), \dots$  — степень насыщения фондов промежуточных продуктов  $A_1, A_2, A_3, \dots, A_k, \dots$  радиоактивным углеродом при продолжительности экспозиции  $t$ ;

$R$  — стационарная скорость прохождения углерода через фонды промежуточных продуктов.

Согласно введенным обозначениям радиоактивность промежуточных продуктов можно выразить:

$$\begin{aligned} P_1(t) &= c_1 x_1(t), \\ P_2(t) &= c_2 x_2(t), \\ P_3(t) &= c_3 x_3(t), \\ &\text{---} \text{---} \text{---} \text{---} \\ P_h(t) &= c_h x_h(t). \end{aligned} \quad (2)$$

Определим прирост радиоактивности первого промежуточного продукта  $A_1$  за единицу времени. Если считать, что степень насыщения углекислого газа  $^{14}\text{C}$  равна единице, то скорость притока радиоактивного углерода в  $A_1$  равняется скорости притока всего углерода  $R$ . Скорость оттока радиоактивного углерода из  $A_1$  равняется  $Rx_1$ , так как среди всех атомов углерода, выходящих из фонда  $A_1$ , доля радиоактивных атомов равняется степени насыщения фонда  $A_1$  —  $x_1$ . Прирост радиоактивности промежуточного продукта  $A_1$  за единицу времени выражается разницей между скоростями притока и оттока радиоактивного углерода:

$$\frac{dP_1}{dt} = R - Rx_1 = R(1 - x_1). \quad (3)$$

Учитывая (2), уравнение (3) можно переписать следующим образом:

$$\frac{dx_1}{dt} = \frac{R}{c_1} (1 - x_1).$$

Аналогично можно составить уравнения и для промежуточных продуктов  $A_2, A_3, A_4$  и т. д. В результате получим следующую систему дифференциальных уравнений (Bassham, Kirk, 1960):

$$\left. \begin{aligned} \frac{dx_1}{dt} &= \frac{R}{c_1} (1 - x_1), \\ \frac{dx_2}{dt} &= \frac{R}{c_2} (x_1 - x_2), \\ \frac{dx_3}{dt} &= \frac{R}{c_3} (x_2 - x_3), \\ &\text{---} \text{---} \text{---} \text{---} \\ \frac{dx_h}{dt} &= \frac{R}{c_h} (x_{h-1} - x_h). \end{aligned} \right\} \quad (4)$$

Последовательное решение уравнений (4) при начальных условиях

$$x_1(0) = x_2(0) = x_3(0) = \dots = x_h(0) = \dots = 0 \quad (5)$$

дает:

$$\begin{aligned} x_1 &= 1 - e^{-\frac{R}{c_1} t}; \\ x_2 &= 1 - \frac{c_1}{c_1 - c_2} e^{-\frac{R}{c_1} t} - \frac{c_2}{c_2 - c_1} e^{-\frac{R}{c_2} t}; \\ x_3 &= 1 - \frac{c_1^2}{(c_1 - c_2)(c_1 - c_3)} e^{-\frac{R}{c_1} t} - \frac{c_2^2}{(c_2 - c_1)(c_2 - c_3)} e^{-\frac{R}{c_2} t} - \frac{c_3^2}{(c_3 - c_1)(c_3 - c_2)} e^{-\frac{R}{c_3} t}; \\ &\text{---} \text{---} \text{---} \text{---} \end{aligned} \quad (6)$$

$$x_k = 1 - \sum_{i=1}^k \frac{c_i^{k-1}}{(c_i - c_1)(c_i - c_2) \dots (c_i - c_{i-1})(c_i - c_{i+1}) \dots (c_i - c_k)} e^{-\frac{R}{c_i} t}.$$

Решения (6) действительны при условиях:

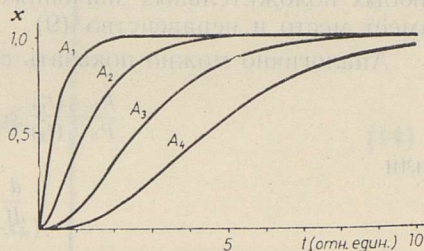
$$c_2 \neq c_1;$$

$$c_3 \neq c_1; c_3 \neq c_2;$$

$$c_k \neq c_1; c_k \neq c_2; c_k \neq c_3; \dots c_k \neq c_{k-1}.$$

Функции (6) выражают зависимость степени насыщения фондов промежуточных продуктов  $^{14}\text{C}$  от продолжительности экспозиции в  $^{14}\text{CO}_2$ . Графическое изображение этой зависимости представлено на рис. 2.

Рис. 2. Изменение степени насыщения промежуточных продуктов  $^{14}\text{C}$  согласно (6). Значения параметров выбраны произвольно:  $R=2$ ;  $c_1=1$ ;  $c_2=2$ ;  $c_3=3$ ;  $c_4=4$ .



Покажем теперь, что если существует последовательность реакций (1), то должны соблюдаться следующие неравенства:

$$\frac{P_1(t_1)}{P_1(t_2)} > \frac{P_2(t_1)}{P_2(t_2)} > \frac{P_3(t_1)}{P_3(t_2)} > \dots > \frac{P_{k-1}(t_1)}{P_{k-1}(t_2)} > \frac{P_k(t_1)}{P_k(t_2)} > \dots, \quad (8)$$

если  $t_2 > t_1$ .

Сперва покажем состоятельность первого неравенства:

$$\frac{P_1(t_1)}{P_1(t_2)} > \frac{P_2(t_1)}{P_2(t_2)} \quad (t_2 > t_1). \quad (9)$$

Так как при каждой  $t$   $P_1$  и  $P_2$  имеют положительные значения, то неравенство (9) можно переписать в виде:

$$\frac{P_1(t_1)}{P_2(t_1)} > \frac{P_1(t_2)}{P_2(t_2)} \quad (t_2 > t_1).$$

Это значит, что при увеличении продолжительности экспозиции соотношение  $P_1/P_2$  должно уменьшаться или, что равноценно, первое производное этого соотношения должно быть меньше нуля:

$$\frac{d}{dt} \left( \frac{P_1}{P_2} \right) = \frac{c_1}{c_2} \frac{d}{dt} \left( \frac{x_1}{x_2} \right) < 0. \quad (10)$$

Учитывая, что  $c_1$  и  $c_2$  положительные числа, имеем

$$\frac{d}{dt} \left( \frac{x_1}{x_2} \right) < 0. \quad (11)$$

Подставляя в неравенство (11) значения  $x_1$  и  $x_2$  из (6) и дифференцируя, получим:

$$\frac{d}{dt} \left( \frac{x_1}{x_2} \right) = \frac{d}{dt} \left[ \frac{1 - e^{-\frac{R}{c_1}t}}{1 - \frac{c_1}{c_1 - c_2} e^{-\frac{R}{c_1}t} - \frac{c_2}{c_2 - c_1} e^{-\frac{R}{c_2}t}} \right] =$$

$$= \frac{R e^{-\frac{R}{c_1}t} e^{-\frac{R}{c_2}t}}{c_1(c_1 - c_2)} \left( c_1 e^{\frac{R}{c_1}t} - c_2 e^{\frac{R}{c_2}t} - c_1 + c_2 \right) < 0.$$

Разлагая функции  $e^{\frac{R}{c_1}t}$  и  $e^{\frac{R}{c_2}t}$  на степенные ряды, получим:

$$\frac{d}{dt} \left( \frac{x_1}{x_2} \right) = -\frac{R^2 t}{c_1} e^{-\frac{R}{c_1}t} e^{-\frac{R}{c_2}t} \sum_{i=1}^{\infty} \frac{1}{(i+1)!} \left( \frac{Rt}{c_1 c_2} \right)^i \frac{c_1^i - c_2^i}{c_1 - c_2} < 0. \quad (12)$$

Легко убедиться, что неравенство (12) соблюдается при каждом  $t$  и при любых положительных значениях параметров  $c_1$ ,  $c_2$  и  $R$ . Следовательно, имеет место и неравенство (9).

Аналогично можно показать состоятельность любого неравенства (8):

$$\frac{P_{h-1}(t_1)}{P_{h-1}(t_2)} > \frac{P_h(t_1)}{P_h(t_2)} \quad (t_2 > t_1)$$

или

$$\frac{d}{dt} \left( \frac{x_{h-1}}{x_h} \right) < 0.$$

В том, что соотношение  $\frac{x_{h-1}}{x_h}$  уменьшается с увеличением продолжительности экспозиции, легко убедиться при помощи графического изложения, приведенного на рис. 2. При любом конечном  $t$  степень насыщения некоторого промежуточного продукта  $x_h$  меньше степени насыщения его непосредственного предшественника  $x_{h-1}$ . Следовательно, при любом конечном  $t$

$$\frac{x_{h-1}}{x_h} > 1.$$

При увеличении продолжительности экспозиции значения  $x_{h-1}$  и  $x_h$  увеличиваются и приближаются асимптотически к единице. Соотношение  $\frac{x_{h-1}}{x_h}$  приближается также к единице, т. е. оно уменьшается с увеличением  $t$ .

На основе приведенных рассуждений можно заключить, что при данной последовательности промежуточных продуктов (1) должны соблюдаться неравенства (8).

Следовательно, неравенства (8) можно рассматривать в качестве критерия для установления последовательности промежуточных продуктов в опытах, где варьирует продолжительность экспозиции.

Перейдем теперь к рассмотрению опытов, в которых после кратковременной экспозиции в атмосфере с  $^{14}\text{CO}_2$  («глотка») растения в течение разного периода выдерживаются в атмосфере без радиоактивного углекислого газа. Степень насыщения промежуточных продуктов  $^{14}\text{C}$  в конце «глотка» продолжительностью  $t_1$  можно найти из формул (6):

$$x_1(t_1) = 1 - e^{-\frac{R}{c_1}t_1};$$

$$\begin{aligned}
 x_2(t_1) &= 1 - \frac{c_1}{c_1 - c_2} e^{-\frac{R}{c_1} t_1} - \frac{c_2}{c_2 - c_1} e^{-\frac{R}{c_2} t_1}; \\
 x_3(t_1) &= 1 - \frac{c_1^2}{(c_1 - c_2)(c_1 - c_3)} e^{-\frac{R}{c_1} t_1} - \frac{c_2^2}{(c_2 - c_1)(c_2 - c_3)} e^{-\frac{R}{c_2} t_1} - \frac{c_3^2}{(c_3 - c_1)(c_3 - c_2)} e^{-\frac{R}{c_3} t_1};
 \end{aligned}
 \tag{13}$$

$$x_k(t_1) = 1 - \sum_{i=1}^k \frac{c_i^{k-1}}{(c_i - c_1)(c_i - c_2) \dots (c_i - c_{i-1})(c_i - c_{i+1}) \dots (c_i - c_k)} e^{-\frac{R}{c_i} t_1}.$$

Дальнейшее изменение степени насыщения во время выдерживания описывается следующими уравнениями:

$$\left. \begin{aligned}
 \frac{dx_1}{dt} &= -\frac{R}{c_1} x_1, \\
 \frac{dx_2}{dt} &= \frac{R}{c_2} (x_1 - x_2), \\
 \frac{dx_3}{dt} &= \frac{R}{c_3} (x_2 - x_3), \\
 \dots & \\
 \frac{dx_k}{dt} &= \frac{R}{c_k} (x_{k-1} - x_k).
 \end{aligned} \right\} \tag{14}$$

Уравнения (14) составлены так же, как (4). Отличие первого уравнения по форме обусловлено тем, что растения выдерживают в углекислом газе, степень насыщения которого  $^{14}\text{C}$  равняется нулю, и поэтому изменение радиоактивности первого продукта  $A_1$  происходит только за счет оттока  $^{14}\text{C}$  из него.

Решения уравнений (14) при начальных условиях (13):

$$\begin{aligned}
 x_1 &= e^{-\frac{R}{c_1} t} \left( e^{\frac{R}{c_1} t_1} - 1 \right), \\
 x_2 &= \frac{c_1}{c_1 - c_2} e^{-\frac{R}{c_1} t} \left( e^{\frac{R}{c_1} t_1} - 1 \right) + \frac{c_2}{c_2 - c_1} e^{-\frac{R}{c_2} t} \left( e^{\frac{R}{c_2} t_1} - 1 \right), \\
 x_3 &= \frac{c_1^2}{(c_1 - c_2)(c_1 - c_3)} e^{-\frac{R}{c_1} t} \left( e^{\frac{R}{c_1} t_1} - 1 \right) + \frac{c_2^2}{(c_2 - c_1)(c_2 - c_3)} e^{-\frac{R}{c_2} t} \left( e^{\frac{R}{c_2} t_1} - 1 \right) + \\
 &\quad + \frac{c_3^2}{(c_3 - c_1)(c_3 - c_2)} e^{-\frac{R}{c_3} t} \left( e^{\frac{R}{c_3} t_1} - 1 \right),
 \end{aligned}
 \tag{15}$$

$$x_k = \sum_{i=1}^k \frac{c_i^{k-1}}{(c_i - c_1)(c_i - c_2) \dots (c_i - c_{i-1})(c_i - c_{i+1}) \dots (c_i - c_k)} e^{-\frac{R}{c_i} t} \left( e^{\frac{R}{c_i} t_1} - 1 \right).$$

Выражения (15) действительны при условиях (7). При помощи равенств (2) и функций (15) для каждого момента выдерживания можно рассчитать радиоактивность отдельных промежуточных продуктов. Изменение радиоактивности промежуточных продуктов  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  и  $A_4$  во время экспозиции и выдерживания изображено на рис. 3. Как видно из приведенных кривых, радиоактивность первого промежуточного продукта ( $A_1$ )

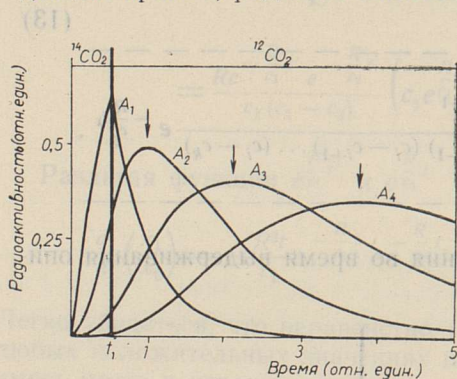


Рис. 3. Изменение радиоактивности промежуточных продуктов во время экспозиции в среде с  $^{14}\text{CO}_2$  (согласно (6)) и выдерживания в среде с  $^{12}\text{CO}_2$  (согласно (15)). Значения параметров такие же, как и на рис. 2,  $t_1=0,5$ .

начинает уменьшаться сразу после замены радиоактивного углекислого газа нерадиоактивным. Что касается последующих продуктов ( $A_2$ ,  $A_3$  и  $A_4$ ), то их радиоактивность в начале выдерживания возрастает, достигает максимума и затем начинает уменьшаться. При этом максимальная радиоактивность некоторого промежуточного продукта достигается всегда позже, чем у его непосредственного предшественника. Отсюда получаем критерий для определения последовательности промежуточных продуктов в опытах с выдерживанием: временная последовательность достижения максимальной радиоактивности отдельных промежуточных продуктов соответствует последовательности этих продуктов на исследуемом пути синтеза.

Следует отметить, что приведенные критерии пригодны для определения последовательности промежуточных продуктов только в незамкнутой цепи реакций. В строгом смысле они не применимы для циклических процессов. Согласно Дж. Бассему (Bassham, 1964), промежуточные продукты фотосинтетического цикла восстановления углерода насыщаются  $^{14}\text{C}$  не последовательно, как в случае незамкнутой цепи ферментативных реакций, а одновременно. В то же время приведенные критерии могут быть успешно использованы при исследовании синтетических путей, получивших начало от промежуточных продуктов цикла и приводящих к образованию конечных продуктов фотосинтеза. Учитывая, что все промежуточные продукты цикла насыщаются  $^{14}\text{C}$  одновременно, можно в этих исследованиях всю совокупность соединений, входящих в фотосинтетический цикл восстановления углерода, условно рассмотреть в качестве первого продукта исследуемого пути синтеза.

Учитывая приведенные критерии, мы провели два кинетических опыта для определения последовательности включения углерода в предполагаемые промежуточные продукты гликолатного пути. В первом опыте варьировали продолжительность экспозиции. Диски из листьев фасоли, находящиеся в состоянии стационарного фотосинтеза, экспонировали в среде с  $^{14}\text{CO}_2$  в течение 1 и 3 мин и фиксировали сразу после окончания экспозиции. Как видно из результатов, приведенных в табл. 1, соотношение радиоактивностей  $P(1)/P(3)$  наивысшее значение имеет у фосфорных эфиров сахаров. В порядке уменьшения значения этого соотношения за фосфорными эфирами следуют гликолевая кислота, глицин, серин и сахароза. Согласно критерию (8), это значит, что синтез рассмотренных веществ протекает в последовательности:  $\text{CO}_2 \rightarrow$  фосфорные эфиры сахаров  $\rightarrow$  гликолевая кислота  $\rightarrow$  глицин  $\rightarrow$  серин  $\rightarrow$  сахароза, что соответствует последовательности реакций гликолатного пути (рис. 1). Следует



Таблица 1

**Радиоактивность  $P(t)$  продуктов гликолатного пути при разной продолжительности экспозиции листьев в атмосфере с  $^{14}\text{CO}_2$**   
(в тыс. имп/мин)

Соединение	Продолжительность экспозиции, мин		$P(1)/P(3)$
	1	3	
Фосфорные эфиры сахаров	343,7	502,6	0,68
Гликолевая кислота	2,7	7,6	0,36
Глицин	7,5	34,0	0,22
Серин	25,0	118,6	0,21
Сахароза	32,9	403,8	0,08

Условия при экспозиции: интенсивность света —  $14,7 \text{ мвт/см}^2$ ; концентрация  $\text{CO}_2$  —  $0,04\%$ ; температура в камере —  $27^\circ$ ; в каждом варианте экспонировалось 6 дисков.

отметить, что соотношение  $P(1)/P(3)$  для гликолевой кислоты меньше соответствующего соотношения для фосфорных эфиров сахаров. Этот результат согласуется с гипотезой об образовании гликолевой кислоты из фосфорных эфиров сахаров (Толберт, 1962; Pritchard и др., 1962; Bassham, 1964).

Во втором опыте варьировали продолжительность выдерживания. После 2-минутной экспозиции в среде с  $^{14}\text{CO}_2$  диски из листьев фасоли и табака выдерживали в обычном воздухе в течение 2, 4, 6 мин. В контрольном варианте диски фиксировали сразу после окончания экспозиции.

Результаты этих опытов приведены на рис. 4. Общая радиоактивность дисков во время выдерживания существенно не изменяется. Это значит, что количество радиоактивного углекислого газа, выделенного за время выдерживания, не превышает ошибку определения общей радиоактивности материала (10%). Однако существенные изменения наблюдаются в радиоактивности отдельных продуктов фотосинтеза, что указывает на перераспределение меченого углерода между соединениями в течение выдерживания. Сразу после выведения диска из среды с  $^{14}\text{CO}_2$  радиоактивность фосфорных эфиров сахаров начинает уменьшаться и происходит особенно быстро в течение первых 2 мин выдерживания. В это же время непрерывно возрастает радиоактивность сахарозы и нерастворимого остатка. Более детальный анализ последнего показал, что среди нерастворимых соединений метятся в основном крахмал и белки. Радиоактивность гликолевой кислоты и глицина (а у табака и серина) в первые минуты выдерживания увеличивается, достигает максимума и затем

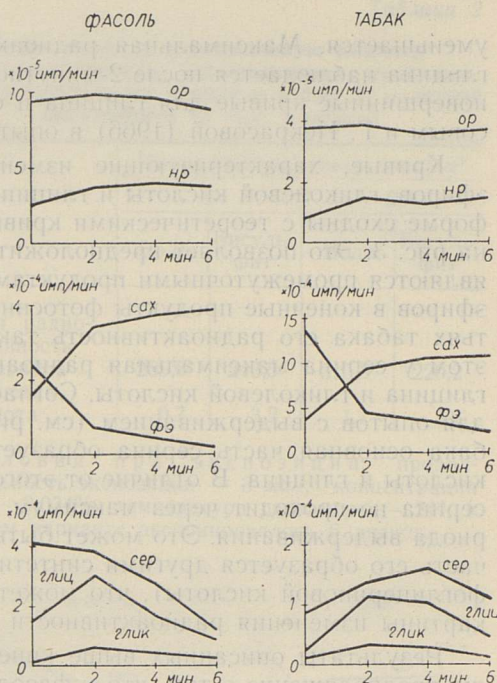


Рис. 4. Изменение радиоактивности продуктов фотосинтеза у листьев фасоли и табака при их выдерживании в обычном воздухе после 2-минутной экспозиции в среде с  $^{14}\text{CO}_2$ . Обозначения: ор — общая радиоактивность материала; нр — нерастворимый в этаноле остаток; сах — сахароза; фэ — фосфорные эфиры сахаров; сер — серин; глиц — глицин; глик — гликолевая кислота. Условия опыта: с листьями фасоли: интенсивность света —  $39 \text{ мвт/см}^2$ ; концентрация  $\text{CO}_2$  —  $0,03\%$ ; температура —  $24^\circ$ ; с листьями табака: интенсивность света —  $40 \text{ мвт/см}^2$ ; концентрация  $\text{CO}_2$  —  $0,03\%$ ; температура —  $24,5^\circ$ .

уменьшается. Максимальная радиоактивность у гликолевой кислоты и глицина наблюдается после 2-минутного выдерживания. Аналогичные односторонние кривые для глицина и серина были получены А. Мокроновым и Г. Некрасовой (1966) в опытах с листьями ячменя.

Кривые, характеризующие изменение радиоактивности фосфорных эфиров, гликолевой кислоты и глицина во время выдерживания, по своей форме сходны с теоретическими кривыми для  $A_1$ ,  $A_2$  и  $A_3$ , приведенными на рис. 3. Это позволяет предположить, что гликолевая кислота и глицин являются промежуточными продуктами на пути превращения фосфорных эфиров в конечные продукты фотосинтеза. Что касается серина, то в листьях табака его радиоактивность также проходит через максимум. При этом у серина максимальная радиоактивность достигается позже, чем у глицина и гликолевой кислоты. Согласно критерию, установленному нами для опытов с выдерживанием (см. рис. 3), это значит, что в листьях табака основная часть серина образуется путем превращения гликолевой кислоты и глицина. В отличие от этого в листьях фасоли радиоактивность серина не проходит через максимум, а уменьшается в течение всего периода выдерживания. Это может быть обусловлено тем, что значительная часть его образуется другими синтетическими путями (например, из фосфоглицериновой кислоты), что может привести к искажению ожидаемой картины изменения радиоактивности серина во время выдерживания.

Результаты описанных выше кинетических опытов подтверждают наше предположение о том, что у фасоли в процессе фотосинтеза участвует гликолатный путь превращения углерода. Следует, однако, учитывать, что некоторые из рассмотренных нами соединений (серин, сахароза) могут образовываться и в результате других реакций. Поэтому не исключена возможность, что кинетические опыты дают только видимую картину о существовании гликолатного пути. Для более подробного доказательства существования вышеуказанной цепи реакций мы исследовали некоторые звенья гликолатного пути при помощи других методов.

#### **Действие бисульфита натрия на метаболизм гликолевой кислоты.**

Один из способов исследования реакций гликолатного пути — применение ингибиторов. Под действием ингибитора, специфически подавляющего скорость некоторой реакции гликолатного пути, накапливается субстрат этой реакции. Например, введение в листья табака сульфоновых кислот, подавляющих активность оксидазы гликолевой кислоты, приводит к накоплению гликолевой кислоты (Zelitch, 1959, 1965; Hess, Tolbert, 1966). Аналогичное действие оказывает также бисульфит натрия, который, вступая в реакцию с эндогенной гликолевой кислотой, превращается в  $\alpha$ -окисульфоновую кислоту (Zelitch, 1957; 1959).

Учитывая эти данные, мы исследовали действие бисульфита натрия на радиоактивность гликолевой кислоты после кратковременных экспозиций листьев фасоли в атмосфере, содержащей  $^{14}\text{CO}_2$ . Опыты проводились при двух интенсивностях света: 5 и 20 мвт/см<sup>2</sup>, из которых первая является лимитирующей, а вторая насыщающей ассимиляцию  $\text{CO}_2$ .

Результаты показывают, что в листьях, обработанных бисульфитом натрия, радиоактивность гликолевой кислоты в 3—5 раз больше, чем в листьях контрольного варианта (табл. 2). На основе данных литературы эти результаты можно объяснить подавлением активности оксидазы гликолевой кислоты бисульфитом натрия. Это значит, что в листьях фасоли функционирует система окисления гликолевой кислоты. Гликолевая кислота является не конечным, а промежуточным продуктом фотосинтеза, в дальнейшем метаболизме которого участвует оксидаза гликолевой кислоты.

Таблица 2

**Включение  $^{14}\text{C}$  в гликолевую кислоту у листьев фасоли, выдержанных предварительно черешками в воде и в 0,01 М растворе бисульфита (в тыс. имп/мин)**

	Интенсивность света, мвт/см <sup>2</sup>			
	5		20	
	Вода	Бисульфит	Вода	Бисульфит
Общая радиоактивность материала	265,5	243,5	315,3	220,2
Гликолевая кислота	0,7	3,2	1,7	5,2

Условия при экспозиции: продолжительность экспозиции — 3 мин; концентрация  $\text{CO}_2$  — 0,034%; температура в камере — 24°; в каждом варианте экспонировалось 6 дисков.

Важно отметить, что бисульфит натрия оказывает действие и на общую скорость ассимиляции  $\text{CO}_2$ . Особенно четко это проявляется при более высокой интенсивности света, когда фотосинтез уменьшается на 30%. Очевидно, бисульфит натрия представляет собой неспецифический ингибитор, который подавляет активность не только оксидазы гликолевой кислоты, но и некоторых других ферментов, в частности тех, которые определяют общую скорость ассимиляции  $\text{CO}_2$  при насыщающих интенсивностях света. Возможно, что бисульфит натрия — конкурентный ингибитор реакции карбоксилирования рибулозодифосфата, так как по некоторым данным акцепторы  $\text{HCO}_3^-$  и  $\text{HSO}_3^-$  могут быть идентичными (Бенсон, 1962).

**Метаболизм экзогенного серина-3- $^{14}\text{C}$ .** При исследовании гликолатного пути широко используется метод, который заключается в изучении метаболизма разных экзогенных меченых субстратов (гликолевая кислота, глицин, серин), химически идентичных с предполагаемыми эндогенными промежуточными продуктами гликолатного пути (Jimenez и др., 1962; Wang, Waygood, 1962:

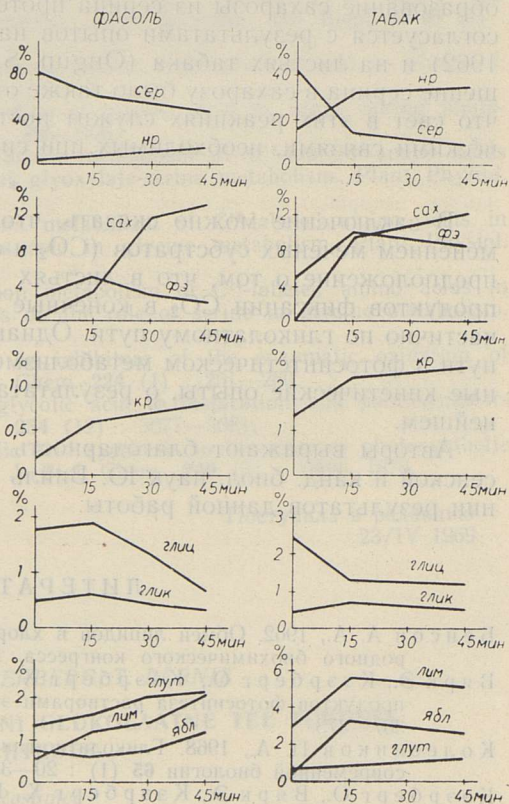


Рис. 5. Метаболизм серина-3- $^{14}\text{C}$  на свету. Обозначения: нр — нерастворимый в этаноле остаток; сер — серин; сах — сахароза; фэ — фосфорные эфиры сахаров; кр — крахмал; глиц — глицин; глик — гликолевая кислота; глут — глутаминовая кислота; лим — лимонная кислота; ябл — яблочная кислота. Интенсивность света в опыте с листьями фасоли — 29,0 мвт/см<sup>2</sup>, с листьями табака — 28,5 мвт/см<sup>2</sup>.

Rabson и др., 1962; Wang, Burriss, 1963, 1965; Ongun, Stocking, 1965a; Mifflin и др., 1966). Предположительно эти субстраты достигают в клетках мест локализации ферментов гликолатного пути и тогда их метаболизм должен протекать так же, как метаболизм соответствующих эндогенных продуктов.

В качестве экзогенного субстрата в наших опытах использовался серин- $3\text{-}^{14}\text{C}$ , который вводили в листья табака и фасоли с током транспирации (см. материал и методику). Результаты этих опытов показаны на рис. 5. На оси абсцисс — продолжительность освещения после 2-часового введения радиоактивного серина в темноте. Результаты представлены в процентах от общей радиоактивности материала. В течение 2-часового темнового периода, который требовался для введения серина в лист, эта аминокислота существенно не метаболизировалась. В момент включения света основная часть  $^{14}\text{C}$  обнаруживается в серине. В меньшей степени мечены нерастворимый остаток и некоторые amino- и органические кислоты. Метка не была обнаружена в сахарозе. На свету наблюдается уменьшение радиоактивности серина, что сопровождается увеличением содержания  $^{14}\text{C}$  в сахарозе, в нерастворимом остатке и некоторых amino- и органических кислотах. При этом перераспределение радиоактивности между отдельными соединениями протекает одинаково в листьях фасоли и табака. Так как в этих опытах серин является единственным радиоактивным субстратом, включение метки в сахарозу и крахмал указывает на потенциальную возможность синтеза углеводов на базе серина. Это означает, что в листьях фасоли существуют ферментные системы, катализирующие образование углеводов по гликолатному пути. При этом образование сахарозы из серина протекает только на свету. Этот факт согласуется с результатами опытов на листьях пшеницы (Jimenez и др., 1962) и на листьях табака (Ongun, Stocking, 1965b), в которых превращение серина в сахарозу было также отмечено только на свету. Возможно, что свет в этих реакциях служит поставщиком соединений с макроэргическими связями, необходимых при синтезе углеводов.

\*

В заключение можно сказать, что результаты наших опытов с применением меченых субстратов ( $\text{CO}_2$  и серин) и ингибитора подтверждают предположение о том, что в листьях фасоли превращение первичных продуктов фиксации  $\text{CO}_2$  в конечные продукты фотосинтеза протекает частично по гликолатному пути. Однако для оценки доли гликолатного пути в фотосинтетическом метаболизме углерода требуются более детальные кинетические опыты, о результатах которых будет сообщено в дальнейшем.

Авторы выражают благодарность доктору биол. наук Н. П. Воскресенской и канд. биол. наук Ю. Вийль за ценные замечания при обсуждении результатов данной работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Бенсон А. А., 1962. Обмен липидов в хлоропластах. В сб.: Труды пятого международного биохимического конгресса. Механизм фотосинтеза: 346—358. М.
- Вярк Э., Кээрберг О., Кээрберг Х., Пярник Т., 1968. Об экстрагируемости продуктов фотосинтеза растворами этанола. Изв. АН ЭССР. Биология **17** (4): 367—373.
- Колесников П. А., 1968. Гликолатно-глиоксалатный цикл в растениях. Успехи современной биологии **65** (1) : 20—33.
- Кээрберг О., Вярк Э., Кээрберг Х., Пярник Т., 1968. О регуляции фотосинтетической ассимиляции  $\text{CO}_2$  условиями освещения. В сб.: На пути к обновлению земли : 280—296. Таллин.
- Мокронос А. Т., Некрасова Г. Ф., 1966. Метаболические аспекты переходных состояний фотосинтеза в индукционном периоде. Физиол. растений **13** (3): 385—397.
- Пярник Т., Кээрберг О., 1966. Усовершенствованная камера для кратковременных экспозиций листьев в атмосфере радиоактивного углекислого газа. Изв. АН ЭССР. Биология **15** (1) : 32—37.

- Толберт Н., 1962. Выделение гликолевой кислоты хлоропластами. В сб.: Структура и функция фотосинтетического аппарата : 274—279.
- Bassham J. A., Kirk M., 1960. Dynamics of the photosynthesis of carbon compounds. I. Carboxylation reactions. *Biochim. Biophys. Acta* **43** (3) : 369—580.
- Bassham J. A., 1964. Kinetic studies of the photosynthetic carbon reduction cycle. *Annual Rev. Plant Physiol.* **15** : 101—120.
- Cossins E. A., Sinha S. K., 1966. The interconversion of glycine and serine by plant tissue extracts. *Biochem. J.* **101** (2) : 542—549.
- Hess J. L., Tolbert N. E., 1966. Glycolate, glycine, serine and glycerate formation during photosynthesis by tobacco leaves. *J. Biol. Chem.* **241** (23) : 5705—5711.
- Jimenez E., Baldwin R. J., Tolbert N. E., Wood W. A., 1962. Distribution of  $C^{14}$  in sucrose from glycolate- $C^{14}$  and serine-3- $C^{14}$  metabolism. *Arch. Biochem. and Biophys.* **98** (1) : 172—175.
- Mifflin B. J., Marker A. F. H., Whittingham C. P., 1966. The metabolism of glycine and glycolate by pea leaves in relation to photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **120** (2) : 266—274.
- Ongun A., Stocking C. R., 1965a. Effect of light and dark on the intracellular fate of photosynthetic products. *Plant Physiol.* **40** (5) : 825—831.
- Ongun A., Stocking C. R., 1965b. Effect of light on the incorporation of serine into the carbohydrates of chloroplasts and nonchloroplasts fractions of tobacco leaves. *Plant Physiol.* **40** (5) : 819.
- Pritchard G. G., Griffin W. J., Whittingham C. P., 1962. The effect of carbon dioxide concentration, light intensity and isonicotinyl hydrazide on the photosynthetic production of glycolic and by *Chlorella*. *J. Exptl. Bot.* **13** (38) : 176—184.
- Rabson R., Tolbert N. E., Kearney P. C., 1962. Formation of serine and glyceric acid by the glycolate pathway. *Arch. Biochem. and Biophys.* **98** (1) : 154—163.
- Tolbert N. E., Cohen M., 1953. Products formed from glycolic acid in plants. *J. Biol. Chem.* **204** (2) : 649—654.
- Tolbert N. E., Zill L. P., 1956. Excretion of glycolic acid by algae during photosynthesis. *J. Biol. Chem.* **222** (2) : 895—906.
- Wang D., Waygood E. R., 1962. Carbon metabolism of  $C^{14}$ -labeled amino acids in wheat leaves. I. A pathway of glyoxylate-serine metabolism. *Plant Physiol.* **37** : 826—832.
- Wang D., Burris R. H., 1963. Carbon metabolism of  $C^{14}$ -labeled amino acids in wheat leaves. II. Serine and its role in glycine metabolism. *Plant Physiol.* **38** (4) : 430—439.
- Wang D., Burris R. H., 1965. Carbon metabolism of  $C^{14}$ -labeled amino acids in wheat leaves. III. Further studies on the role of serine in glycine metabolism. *Plant Physiol.* **40** (3) : 415—418.
- Zelitch I., 1957.  $\alpha$ -Hydroxysulfonates as inhibitors of the enzymatic oxidation of glycolic and lactic acids. *J. Biol. Chem.* **224** (1) : 251—260.
- Zelitch I., 1959. The relationship of glycolic acid to respiration and photosynthesis in tobacco leaves. *J. Biol. Chem.* **234** (12) : 3077—3081.
- Zelitch I., 1965. The relation of glycolic acid synthesis to the primary photosynthetic carboxylation reaction in leaves. *J. Biol. Chem.* **240** (5) : 1869—1876.

Институт экспериментальной биологии  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
23/IV 1969

EDA VÄRK, O. KEERBERG, HILLE KEERBERG, T. PÄRNİK

## SÜSINIKU ASSIMILATSIOONI GLÜKOLAATNE TEE TÜRGIOA LEHTEDES

### Resüme

Et näidata glükolaatse tee reaktsioonide olemasolu türgioa 14-päevaste tainede esmastes lehtedes, jälgiti  $^{14}C$  lülitumise kineetikat fotosünteesi vahe- ja lõpp-produktidesse lehtede eksponeerimisel  $^{14}CO_2$  keskkonnas ja nende ekspositsioonijärgsel hoidmisel tavalises õhus. Uuriti ka eksogeense 3- $^{14}C$ -seriini metabolismi türgioa lehtedes ning naatriumbisulfiti (glükoolhappe oksüdaasi inhibiitori) mõju märke lülitumisele  $^{14}CO_2$ -st glükoolhappesse. Töötati välja kriteeriumid produktide järgnevuse hindamiseks. Kineetiliste katsete tulemuste tõlgendamisel võimaldasid need kindlaks teha, et türgioa

lehtedes eksisteerib reaktsioonide järjestus  $\text{CO}_2 \rightarrow$  suhkrute fosfoestrid  $\rightarrow$  glükoolhape  $\rightarrow$   $\rightarrow$  glütsiin  $\rightarrow$  seriin  $\rightarrow$  ...  $\rightarrow$  sahharoos. Lehtedesse sisestatud naatriumbisulfiiti toimel suurenes glükoolhappe radioaktiivsus 3–5-kordseks. Järelikult ei ole glükoolhappe fotosünteesi lõpp-, vaid vaheproduktiks; tema edasine metabolism toimub glükoolhappe oksüdaasi osavõtul. Valguse käes olid eksogeense  $3\text{-}^{14}\text{C}$ -seriini muundumise põhilisteks produktideks sahharoos ja tärklis, mis näitab, et on olemas potentsiaalne võimalus nende süsivesikute biosünteesiks seriini baasil. Saadud tulemuste põhjal oletatakse, et türgioa lehtedes kulgeb  $\text{CO}_2$  fikseerimise esmaste produktide muundumine fotosünteesi lõpp-produktideks osaliselt glükolaatset teed kaudu.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia  
Eksperimentaalbioloogia Instituut

Saabus toimetusse  
23. IV 1969

EDA VÄRK, O. KEERBERG, HILLE KEERBERG, T. PÄRNIK

### GLYCOLLATE PATHWAY OF CARBON ASSIMILATION IN THE LEAVES OF KIDNEY BEAN

#### Summary

The reactions of glycolate pathway in 14-day-old kidney bean leaves were investigated using  $^{14}\text{CO}_2$ . The kinetics of the incorporation of  $^{14}\text{C}$  from  $^{14}\text{CO}_2$  into intermediates and end products of photosynthesis were studied during the exposition of leaves in  $^{14}\text{CO}_2$  and the following exposition in  $^{12}\text{CO}_2$ . Besides that, the influence of sodium bisulphite (the inhibitor of glycollic acid oxidase) upon the labelling of glycollic acid with  $^{14}\text{C}$  from  $^{14}\text{CO}_2$  and the metabolism of exogenous serine- $3\text{-}^{14}\text{C}$  were followed. The criteria for estimating the sequence of intermediates on a biosynthetic pathway were worked out mathematically. Using these criteria for the interpretation of the results of kinetic experiments, the following sequence of reactions was established:  $\text{CO}_2 \rightarrow$  sugar phosphates  $\rightarrow$  glycollic acid  $\rightarrow$  glycine  $\rightarrow$  serine  $\rightarrow$  ...  $\rightarrow$  sucrose. In leaves treated with sodium bisulphite, the radioactivity of glycollic acid was 3–5 times higher than in untreated leaves. The conclusion was drawn that glycollic acid was not an end product of photosynthesis, but an intermediate. Sucrose and starch were the main products of the metabolism of exogenous serine- $3\text{-}^{14}\text{C}$  in the light. It indicates that bean leaves are able to use serine as a substrate for the synthesis of starch and sucrose. It is suggested that the conversion of the primary products of the  $\text{CO}_2$  fixation in the leaves of kidney bean proceeds partially by the glycolate pathway.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,  
Institute of Experimental Biology

Received  
April 23, 1969