

ТИЙТ ПЯРНИК, ЭДА ВЯРК, ОЛАВ КЭЭРБЕРГ, ХИЛЛЕ КЭЭРБЕРГ

О ПРИМЕНЕНИИ ДИСКОВ ИЗ ЛИСТЬЕВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПРОДУКТОВ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АССИМИЛЯЦИИ CO_2

В предыдущей работе было показано, что временной ход фотосинтеза дисков из листьев фасоли после их вырезания и начала освещения можно условно разделить на три части: переходный период, стационарное состояние и подавление фотосинтеза (Пярник и др., 1971). При этом стационарная скорость ассимиляции CO_2 дисков, водоснабжение которых прекращено, сохраняется в течение 5—10 мин и дольше в зависимости от внешних условий и предварительной обработки растений. На основе полученных данных был сделан вывод, что в ряде опытов по изучению скорости ассимиляции CO_2 диски из листьев могут быть использованы так же успешно, как и целые листья или суспензии водорослей.

Однако только на основе данных о газообмене фотосинтеза нельзя решить вопрос о применимости дисков из листьев для изучения продуктов ассимиляции CO_2 . В ряде работ показано, что в связи с отрезанием и обезвоживанием в дисках изменяется скорость синтеза и соотношение отдельных продуктов фотосинтетической ассимиляции CO_2 (Тарчевский, 1964; Беликов, Асафов, 1968). Изменения в синтезе отдельных соединений иногда наблюдаются даже в том случае, когда скорость фотосинтеза остается постоянной (Мокронос, Иванова, 1970).

Эти работы заставляют относиться с некоторой осторожностью к результатам, полученным при использовании дисков листьев. После вырезания в дисках могут иметь место непрерывные изменения метаболизма углерода, что затрудняет их применение при исследовании продуктов фотосинтеза. Для выяснения значения этих изменений у фасоли, в настоящей работе исследовался временной ход образования продуктов ассимиляции CO_2 в дисках из листьев этой культуры, что позволяет оценить возможность их применения при исследовании стационарных процессов фотосинтеза. В дополнительном опыте сравнивали метаболизм $^{14}\text{CO}_2$ в дисках, вырезанных из листьев растущих растений, и в дисках, вырезанных из листьев, которые предварительно выдерживали черешками в воде. Целью этого опыта было выяснить, каким образом нарушение взаимных связей листа и растения влияет на метаболизм углерода у фасоли.

Материал и методика

В опытах использовались 14-дневные растения фасоли (*Phaseolus vulgaris*, 'Масличная ранняя'), выращенные на почве под люминесцентными лампами при интенсивности света 5—6 мвт/см². Продолжительность суточного освещения была 16 ч (от 6

до 22 ч). За час до начала опыта растения переносили в лабораторию, где они выдерживались под лампой ДРЛ-400 при низкой интенсивности света ($0,8 \text{ мвт/см}^2$).

Экспозиция проводилась в одной из камер, конструкция которых описана нами ранее (Пярник, Кээрберг, 1966; Пярник, Кээрберг, 1969). Для этого из первых после семядолей листьев вырезались диски диаметром 24 мм, которые в течение определенного промежутка времени (5, 8, 11 и 14 мин) освещались в нерадиоактивной среде и затем в течение 2 мин экспонировались в $^{14}\text{CO}_2$.

После экспозиции диски фиксировали в кипящем 80%-ном этаноле. Меченые соединения экстрагировали водными растворами этанола и разделяли при помощи двухмерной хроматографии на бумаге (Вярк и др., 1968; Вярк и др., 1970). Радиоактивность отдельных соединений определялась торцовыми счетчиками либо прямо на бумаге, либо после элюирования их. Результаты измерений выражались в абсолютных единицах радиоактивности — в микрограмм-атомах ^{14}C на дм^2 ($\text{мкг-атом } ^{14}\text{C/дм}^2$) и в процентах от общей радиоактивности материала.

Результаты и обсуждение

Включение метки в продукты ассимиляции CO_2 в переходном периоде. На рис. 1 приведены результаты опыта, в котором исследовалось включение метки в отдельные соединения в зависимости от продолжительности предварительного освещения дисков во время перехода фотосинтеза в стационарное состояние (в переходном периоде). Опыт был проведен при температуре камеры $20,5^\circ\text{C}$ (температура диска 23°) и при относительной влажности 70%. В этих условиях стационарное состояние фотосинтеза устанавливается к 15-й минуте. Сравнительно медленное изменение скорости фотосинтеза в переходном периоде позволяет провести экспозиции дисков в $^{14}\text{CO}_2$ длительностью достаточной для определения радиоактивности всех основных продуктов ассимиляции CO_2 в нескольких точках временной кривой фотосинтеза.

Во время перехода фотосинтеза в стационарное состояние увеличивается радиоактивность фосфорных эфиров сахаров (ФЭС) и фосфоглицериновой кислоты (ФГК). При этом относительная радиоактивность ФГК+ФЭС падает от 45 до 31,5%. Такое же изменение абсолютной и относительной радиоактивности было отмечено у аланина и аспарагиновой кислоты. В первые минуты освещения содержания ^{14}C в гликолевой кислоте, глицине и серине возрастает и достигает к 9-й минуте постоянного уровня. В то же время относительная радиоактивность этих соединений уменьшается в несколько раз. Радиоактивность конечных продуктов фотосинтеза — сахарозы и крахмала — повышается как в абсолютном, так и в процентном выражении. Скорость включения метки в рассмотренные соединения стабилизируется к 12–15 минуте, т. е. к тому же времени, когда устанавливается стационарная скорость фотосинтеза.

Описанные выше сдвиги в распределении ^{14}C между отдельными продуктами можно объяснить изменениями в снабжении хлоропластов углекислым газом во время переходного периода. В нашей предыдущей работе было показано, что при насыщающих интенсивностях света и низкой концентрации CO_2 переход фотосинтеза в стационарное состояние определяется главным образом открыванием устьиц (Пярник и др., 1971). В результате этого во время переходного периода увеличивается скорость притока CO_2 в хлоропласты, что приводит к постепенному возрастанию его концентрации в центрах карбоксилирования. При повышении концентрации CO_2 уменьшается фонд акцептора CO_2 — рибулезо-1,5-дифосфата (РудФ) и повышается величина фонда ФГК (Wilson, Calvin, 1955). РудФ является предполагаемым исходным

веществом для гликолатного пути, через который в листьях фасоли образуется значительная часть гликолевой кислоты, глицина и серина (Вярк и др., 1970; Кээрберг и др., 1970). Следовательно, увеличение концентрации CO_2 в реакционных центрах и связанное с этим уменьшение фонда РудФ должно привести к подавлению скорости протока углерода через гликолатный путь и уменьшению относительной радиоактивности гликолевой кислоты, глицина и серина во время переходного периода.

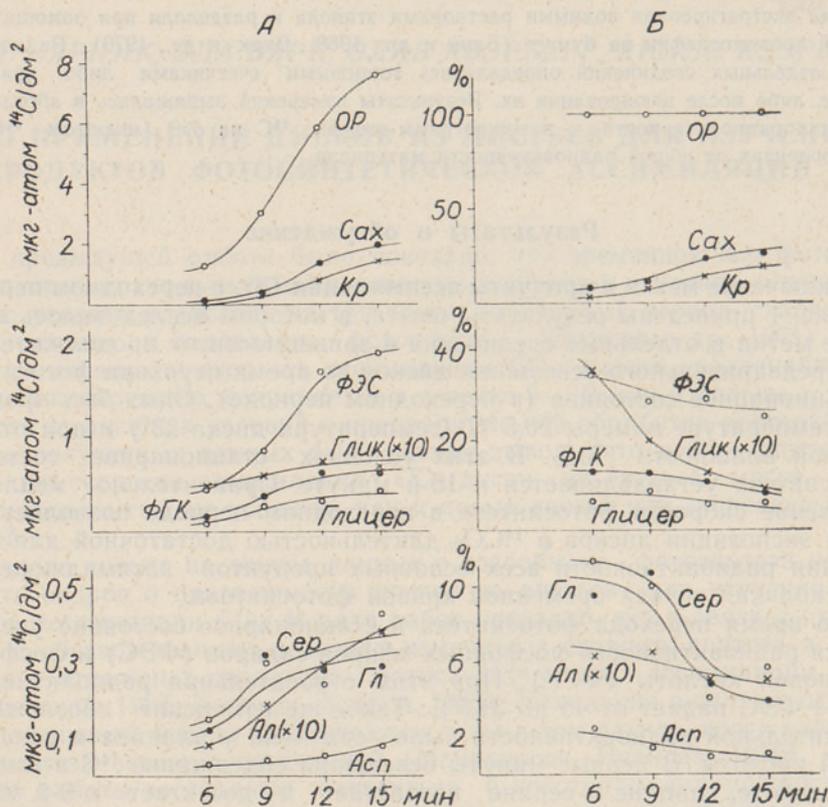


Рис. 1. Включение ^{14}C в продукты двухминутной ассимиляции $^{14}\text{CO}_2$ дисками из листьев фасоли в зависимости от продолжительности предварительного освещения во время переходного периода фотосинтеза. Радиоактивность продуктов выражена в абсолютных (А) и относительных (Б) единицах.

Обозначения: ОР — общая радиоактивность; сах — сахароза; кр — крахмал; ФЭС — фосфорные эфиры сахаров; глик — гликолевая кислота; ФГК — фосфоглицериновая кислота; глицер — глицериновая кислота; сер — серин; гл — глицин; ал — аланин; асп — аспарагиновая кислота. Условия опыта: интенсивность света — $19,7 \text{ мвт/см}^2$; концентрация CO_2 — $0,03\%$; температура листа 23°C ; продолжительность экспозиции в $^{14}\text{CO}_2$ — 2 мин ; в каждом варианте экспонировалось 6 дисков.

Одновременно с этим возрастает содержание ^{14}C в ФГК. Некоторое уменьшение ее относительной радиоактивности показывает, что во время переходного периода величина фонда ФГК возрастает медленнее, чем скорость фотосинтеза. Этим можно объяснить уменьшение относительной радиоактивности аланина и аспарагиновой кислоты, образующихся из ФГК.

Во время перехода фотосинтеза в стационарное состояние наблюдалось сильное повышение как абсолютной, так и относительной активности сахарозы и крахмала. А. Мокронос и Г. Некрасова (1966) показывают, что превращение ФГК → сахароза протекает тем быстрее, чем ближе фотосинтез к стационарному состоянию. По их мнению, причинами угнетения синтеза сахарозы в начале переходного периода могут быть задержка восстановления ФГК до углеводов из-за недостатка макроэргических продуктов и восстановителей и частичная инактивация ферментов углеводного синтеза во время предшествующего темного периода. В связи с этим следует обратить внимание на обстоятельство, что АДФ-*d*-глюкозо-пирофосфорилаза, участвующая в синтезе крахмала, ингибируется неорганическим фосфатом и активируется фосфоглицериновой кислотой (Ghosh, Preiss, 1966). Возможно, что уменьшение концентрации неорганического фосфата и увеличение фонда ФГК во время переходного периода повышают активность этого фермента и вместе с тем скорость синтеза крахмала (Bassham, Jensen, 1967). С другой стороны, можно предполагать, что увеличение скорости синтеза углеводов связано с динамической регуляцией цикла восстановления углерода. После включения света в цикле могут произойти такие изменения, которые приводят к постепенному возрастанию фонда фруктозо-6-фосфата — исходного вещества для синтеза углеводов.

Включение метки в продукты ассимиляции CO₂ после установления стационарного состояния фотосинтеза дисков. На рис. 2 приведены данные о распределении ¹⁴C в отдельных соединениях в зависимости от продолжительности предварительного освещения в стационарном состоянии и в начальной стадии подавления фотосинтеза дисков. Опыт проводился при высокой температуре листа (31°) и низкой относительной влажности воздуха (меньше 40%). В таких условиях стационарное состояние фотосинтеза устанавливается быстро (к 6-й минуте) и сохраняется в течение сравнительно короткого периода. Из рис. 2А видно, что заметное подавление скорости фотосинтеза начинается уже после 9-минутного предварительного освещения и к 15-й минуте фотосинтез уменьшается на 25%. Несмотря на жесткие условия, примененные в данном опыте, изменения в распределении ¹⁴C относительно невелики. Наиболее существенные изменения наблюдаются у сахарозы, крахмала и глицериновой кислоты, радиоактивность которых во время выдерживания дисков постепенно снижается. Уменьшается также относительная радиоактивность крахмала и глицериновой кислоты. Наряду с этим несколько возрастает процентная доля ФГК, лимонной, яблочной и гликолевой кислот, глицина и серина среди продуктов фотосинтеза. Аналогичные сдвиги в распределении метки после отрезания листьев фасоли были отмечены П. Беликовым и Г. Асафовым (1968).

Перечисленные выше изменения обусловлены, по-видимому, постепенным обезвоживанием дисков во время выдерживания. Это может привести к увеличению сопротивления диффузии CO₂ в результате закрывания устьиц (Willis и др., 1963; Вгун, 1965; Пярник и др., 1971), а также к изменению активности некоторых ферментов и подавлению скорости фотофосфорилирования (Сисакян, 1940; Тарчевский, 1964; Nig, Poljakoff-Mayber, 1967). Уменьшение скорости диффузии CO₂, согласно рассуждениям в предыдущем разделе, должно привести к увеличению скорости протока углерода через гликолатный путь. Этим можно объяснить увеличение относительной радиоактивности гликолевой кислоты, глицина и серина, наблюдаемое в данном опыте. Изменение радиоактивности глицериновой кислоты и углеводов обусловлено, вероятно, подавлением активности ферментов, участвующих в синтезе

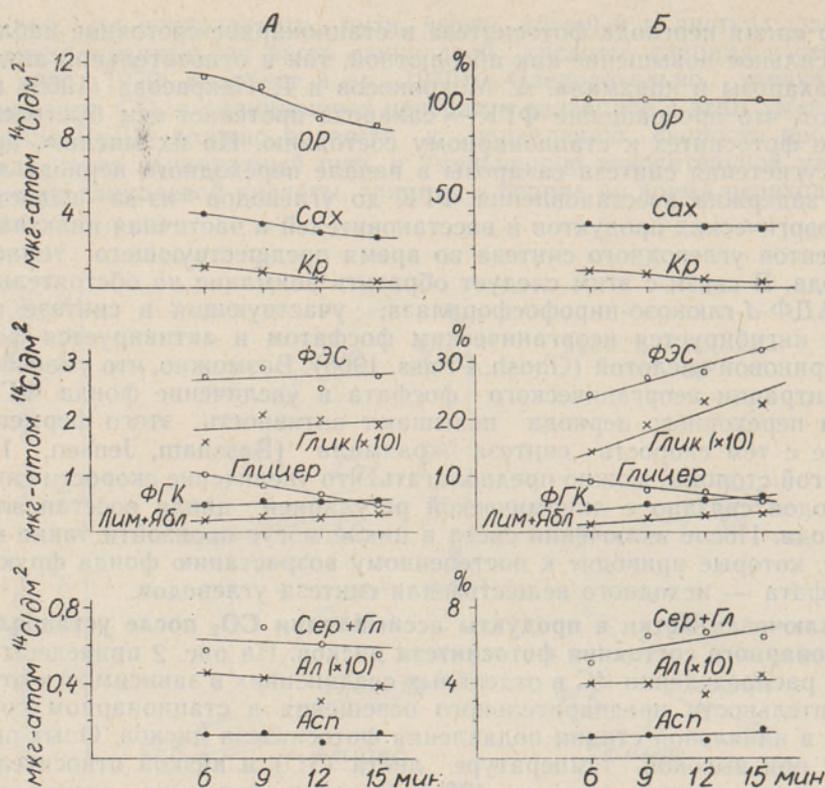


Рис. 2. Включение ^{14}C в продукты двухминутной ассимиляции $^{14}\text{CO}_2$ дисками из листьев фасоли в зависимости от продолжительности предварительного освещения в стационарном состоянии и в начале подавления фотосинтеза. Радиоактивность продуктов выражена в абсолютных (А) и относительных (Б) единицах.

Обозначения: лим — лимонная кислота, ябл — яблочная кислота, остальные обозначения см. на рис. 1. Условия опыта: интенсивность света — $20,5 \text{ мвт/см}^2$; концентрация CO_2 — $0,03\%$; температура листа — 31°C ; продолжительность экспозиции в $^{14}\text{CO}_2$ — 2 мин; в каждом варианте экспонировалось 6 дисков.

этих соединений. По-видимому, при обезвоживании диска происходит частичная инактивация фосфатаз, в результате чего равновесие реакции $\text{ФГК} \rightleftharpoons \text{глицериновая кислота}$ постепенно перемещается в сторону ФГК. Кроме того, увеличение водного дефицита вызывает подавление реакций полимеризации. На это указывает уменьшение относительной радиоактивности крахмала (от 9,6 до 3,6%), в то время как у сахарозы она остается постоянной. Этот результат согласуется с хорошо известным явлением, состоящим в том, что при водном дефиците в листьях уменьшается количество крахмала и увеличивается содержание сахарозы (Сисакян, 1940).

Рассмотренные выше изменения в продуктах относительно небольшие и в первом приближении их можно считать линейными во времени. Это обстоятельство позволяет использовать диски из листьев в кинетических опытах, где изучают включение ^{14}C в разные продукты фотосинтеза в зависимости от продолжительности экспозиции в $^{14}\text{CO}_2$. При этом следует варьировать длительность предварительного освещения с таким расчетом, чтобы промежуток времени от начала освещения до

Распределение ^{14}C в продуктах фотосинтеза у дисков, вырезанных из листьев растущих растений фасоли, и из листьев, выдержанных в течение двух часов черешками в воде (% от общей радиоактивности материала)

Соединение	Листья растущих растений		Листья, выдержанные в воде	
	Опыт		Опыт	
	I	II	I	II
Фосфорные эфиры (включая ФГК)	14,7	9,7	13,5	10,3
Сахароза	24,8	25,9	25,6	22,9
Мальтоза	0,58	0,48	0,35	0,38
Глюкоза	0,36	0,24	0,38	0,31
Фруктоза	0,26	0,25	0,35	0,27
Сумма:	26,00	26,87	26,68	23,86
Серин	4,33	4,62	4,76	4,58
Глицин	1,24	1,89	1,01	1,86
Гликолевая кислота	0,29	0,38	0,18	0,28
Сумма:	5,86	6,89	5,95	6,72
Аланин	1,63	1,51	2,87	1,96
Аспарагиновая кислота	0,30	0,35	0,30	0,51
Глутаминовая кислота	0,25	0,40	0,28	0,43
Глицериновая кислота	5,74	4,56	6,10	4,88
Яблочная кислота	0,10	0,16	0,18	0,21
Лимонная кислота	0,32	0,25	0,25	0,28
Сумма:	8,34	7,23	9,98	8,27
Нерастворимый остаток (включая крахмал)	38,6	41,1	36,0	38,1
Поглощение $^{14}\text{CO}_2$ (мкг-атом $^{14}\text{CO}_2/\text{дм}^2$)	7,6	10,3	7,1	9,4

Условия опыта: интенсивность света в опыте I—16 мвт/см², в опыте II — 54 мвт/см²; концентрация CO₂ — 0,033%; температура в камере — 29,1°; продолжительность предварительного освещения — 7 мин; продолжительность экспозиции в $^{14}\text{CO}_2$ — 3 мин; в каждом варианте экспонировалось 6 дисков.

среднего момента экспонирования в $^{14}\text{CO}_2$ был бы одинаков для всех вариантов (Пярник и др., 1971). Такой метод позволяет характеризовать состояние фотосинтетического аппарата в некоторой заданной точке на временной кривой фотосинтеза дисков. В ряде опытов по изучению действия разных факторов на фотосинтез нет необходимости для проведения кинетического анализа продуктов. В таком случае следует составить временной график так, чтобы экспонирование дисков в $^{14}\text{CO}_2$ проводилось в стационарном состоянии фотосинтеза и в одинаковых условиях в отношении обезвоживания.

Влияние предварительного выдерживания листьев в воде на включение ^{14}C в продукты ассимиляции CO₂. Выдерживание листьев черешками в водных растворах разных субстратов и эффекторов является методическим приемом, часто применяемым при изучении механизма фотосинтеза. При этом в течение длительного времени прекращены взаимные связи листа и растения, что может привести к существенному из-

менению метаболизма листьев, в частности, соотношения отдельных путей образования продуктов фотосинтеза. Для оценки значения этих возможных изменений у данного подопытного объекта — фасоли мы сравнивали включение метки в продукты ассимиляции $^{14}\text{CO}_2$ у дисков, вырезанных из листьев растущих растений, и у дисков из листьев, предварительно выдержанных в течение двух часов черешками в воде.

Результаты двух параллельных опытов приведены в таблице. Из таблицы видно, что при выдерживании листьев общая скорость фотосинтеза изменяется незначительно — ее уменьшение в опытах I и II составляет соответственно 6,6 и 8,7%. Существенных изменений не было обнаружено также в распределении ^{14}C между отдельными соединениями. Относительная радиоактивность фосфорных эфиров сахаров, углеводов и промежуточных продуктов гликолатного пути остается практически неизменной. Некоторое увеличение радиоактивности наблюдается только у аланина, синтез которого, по-видимому, является наиболее чувствительным звеном в отношении воздействия неблагоприятных факторов (Тарчевский, 1964).

Проведенные опыты показывают, что прекращение взаимных связей листа и растения не вызывает существенных изменений в метаболизме CO_2 у листьев 14-дневных растений фасоли. Это позволяет применять их в качестве объекта в опытах, где исследуют продукты фотосинтеза после введения в листья разных веществ. Возможно, однако, что наблюдаемая нами стабильность фотосинтетического метаболизма не является всеобщим свойством растений, а характерна только некоторым видам и листьям определенного возраста (Мокроносов, Иванова, 1970).

В заключение можно сказать, что через определенное время после вырезания диска и начала его освещения в нем устанавливается постоянная скорость фотосинтеза и стационарное распределение углерода в продуктах ассимиляции CO_2 . При соблюдении соответствующего временного графика экспонирования диски из листьев фасоли могут быть использованы для исследования действия разных факторов на продукты фотосинтеза и определения кинетики включения ^{14}C в разные соединения, образующиеся в процессе фотосинтетического восстановления углерода.

Авторы выражают благодарность кандидату биологических наук Ю. Вийль за ценные замечания в ходе подготовки настоящей статьи.

ЛИТЕРАТУРА

- Беликов П. С., Асафов Г. Б., 1968. Установка для изучения стационарных и переходных состояний фотосинтеза. Изв. ТСХА (2) : 24—34.
- Вярк Э., Кээрберг Х., Кээрберг О., Пярник Т., 1968. Об экстрагируемости продуктов фотосинтеза растворами этанола. Изв. АН ЭССР. Биол. 17 (4) : 367—373.
- Вярк Эда, Кээрберг О., Кээрберг Хилле, Пярник Т., 1970. Исследование гликолатного пути ассимиляции углерода в листьях фасоли. Изв. АН ЭССР. Биол. 19 (1) : 3—16.
- Кээрберг О. Ф., Вярк Э. Я., Кээрберг Х. И., Пярник Т. Р., 1970. Исследование кинетики включения ^{14}C в продукты фотосинтеза у листьев фасоли. Докл. АН СССР 195 (1) : 238—241.
- Мокроносов А. Т., Некрасова Г. Ф., 1966. Метаболические аспекты переходных состояний фотосинтеза в индукционном периоде. Физиол. растений 13 (3) : 385—397.
- Мокроносов А. Т., Иванова Н. А., 1970. Фотосинтетическая функция листа картофеля в автономном и системном режимах. Физиол. растений 17 (2) : 265—273.
- Пярник Т., Кээрберг О., 1966. Усовершенствованная камера для кратковременных экспозиций листьев в атмосфере радиоактивного газа. Изв. АН ЭССР. Биол. 15 (1) : 32—37.

- Пярник Т. Р., Кээрберг О. Ф., 1969. Многоканальная экспозиционная камера для исследования фотосинтеза в дисках листьев. Физиол. растения 16 (6) : 1114—1119.
- Пярник Тийт, Вийль Юта, Вярк Эда, Кээрберг Олав, Кээрберг Хилле, 1971. О применении дисков из листьев для изучения газообмена фотосинтеза. Изв. АН ЭССР. Биол. 20 (3) : 232—241.
- Тарчевский И. А., 1964. Фотосинтез и засуха. Изд. Казанского ун-та.
- Сисакян Н. М., 1940. Биохимическая характеристика засухоустойчивости растений. М.—Л.
- Bassham J. A., Jensen R. G., 1967. Photosynthesis of carbon compounds. In: Harvesting the Sun. Photosynthesis in plant life. New York—London: 79—110.
- Brun W. A., 1965. Rapid changes in transpiration in banana leaves. Plant Physiol. 40 (5) : 797—802.
- Ghosh H. P., Preiss J., 1966. Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase. A regulatory enzyme in the biosynthesis of starch in spinach leaf chloroplasts. J. Biol. Chem. 241 (19) : 4491—4504.
- Nir I., Poljakoff-Mayber A., 1967. Effect of water stress on the photochemical activity of chloroplasts. Nature 213 (5074) : 418—419.
- Willis A. J., Yemm E. W., Balasubramaniam S., 1963. Transpiration phenomena in detached leaves. Nature 199 (4890) : 265—266.
- Wilson A. T., Calvin M., 1955. The photosynthetic cycle. CO₂ dependent transients. J. Am. Chem. Soc. 77 : 5948—5957.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
3/II 1971

TIIT PÄRNIK, EDA VÄRK, OLAV KEERBERG, HILLE KEERBERG

LEHEKETASTE KASUTAMISEST CO₂ FOTOSÜNTEETILISE ASSIMILATSIOONI PRODUKTIDE UURIMISEL

Resümee

14-päevaste türgioa (*Phaseolus vulgaris*) taimede esmastest lehtedest lõigatud ketastel uuriti radioaktiivse süsiniku lülitumist ¹⁴CO₂ lühiajalise assimilatsiooni produktidesse sõltuvalt leheketaste eelnenud valgustuse kestusest mitteradioaktiivses keskkonnas.

Samaaegselt CO₂ assimilatsiooni statsioonarse kiiruse saabumisega läheneb püsivale tasemele ka ¹⁴C lülitumine üksikutesse ühenditesse. Leheketaste pikemaajalisel hoidmisel algab fotosünteesi pärssimine, millega kaasneb ¹⁴C tärkliksesse ja glütseriinhappesse lülitumise aeglustumine. See näitab, et kõige tundlikumateks reaktsioonideks leheketastes süveneva veedefitsiidi suhtes on süsivesikute polümerisatsioon ja fosfoglütseriinhappe defosforüleerumine. Fotosünteesi aeglustumisel 25% võrra on muutused ¹⁴C jaotumises suhteliselt väikesed ja esimeses lähenduses võib neid lugeda ajaliselt lineaarseteks.

Katsetulemuste põhjal järeldatakse, et vastava ekspositsioonigraafiku järgimisel on võimalik türgioa leheketaste abil uurida mitmesuguste faktorite toimet ja ¹⁴C lülitumise kineetikat fotosünteesi produktidesse.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Ekspérimentaalbioloogia Instituut

Toimetusse saanud
3. II 1971

TIIT PÄRNIK, EDA VÄRK, OLAV KEERBERG, HILLE KEERBERG

ON THE APPLICATION OF LEAF DISCS FOR STUDYING PRODUCTS OF PHOTOSYNTHETIC CO₂ ASSIMILATION

Summary

Incorporation of ¹⁴C into products of short-time ¹⁴CO₂ assimilation as the function of the duration of the preliminary illumination in ¹⁴CO₂ was studied in leaf discs of 14-day old kidney bean plants.

Concurrently with achieving the steady rate of the CO₂ assimilation, the steady state of labelling various compounds was established. Prolonged expositions of leaf discs caused

suppression of their photosynthesis, accompanied by a decrease in the rate of ^{14}C incorporation into starch and glyceric acid. This indicates that the reactions most sensitive to the developing water stress were polymerization of carbohydrates and dephosphorylation of phosphoglyceric acid. Although the rate of photosynthesis might decrease by 25 per cent, the changes in labelling pattern of various compounds were relatively small and could be considered linear with time.

A conclusion is made that if to choose the appropriate time regime of exposition, leaf discs of bean leaves may be successfully used for studying effects of a variety of factors upon photosynthesis products and kinetics of ^{14}C incorporation into compounds synthesized by photosynthetic carbon reduction.

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

Received
Feb. 3, 1971