

Агу ЛАЙСК, Велло ОЯ

АКТИВНОСТЬ РИБУЛОЗОДИФОСФАТКАРБОКСИЛАЗЫ В ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ЛИСТЬЯХ ОСИНЫ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ СВЕТА

Детальными биохимическими исследованиями установлено, что некоторые ферменты фотосинтетического цикла восстановления углерода ингибируются при отсутствии света (Bassham, Jensen, 1967; Бассем, 1972; Preiss, Kosuge, 1970). Прежде всего к таковым относятся дифосфатазы и карбоксилаза рибулозодифосфата, катализирующие реакции с большим изменением свободной энергии (Bassham, Krause, 1969). Эти результаты получены из экспериментов с одноклеточными водорослями и хлоропластами, выделенными из листьев. Представляет интерес выяснить, в какой мере регуляторное действие света отражается на интенсивности газообмена листьев. Другими словами, можно ли обнаружить какие-либо переходные явления, которые невозможно объяснить только энергетическим действием света и колебаниями фондов промежуточных продуктов цикла.

Легче всего газометрическому исследованию подвергаются изменения активности рибулозодифосфаткарбоксилазы. Существуют прямые доказательства (Jensen, Bassham, 1968) того, что в изолированных хлоропластах реакция карбоксилирования активируется светом.

Мерой активности карбоксилазы рибулозодифосфата может служить начальный наклон такой углекислотной кривой фотосинтеза листа, у которой по оси абсцисс отложены значения концентрации CO_2 в фотосинтезирующих клетках мезофилла (так наз. PC_w -кривые). Начальная часть этой кривой по существу является кинетической кривой реакции карбоксилирования. Наклон кинетической кривой при малой концентрации субстрата является константой скорости реакции первого порядка, которая может быть принята за меру активности фермента, катализирующего данную реакцию (Номенклатура ферментов, 1966). Для интенсивности ассимиляции P при малых концентрациях углекислого газа можем написать выражение (Laisk, 1970; Лайск, 1973).

$$P = k[\text{ЕРДФ}]C_w, \quad (1)$$

или

$$\frac{dP}{dC_w} = k[\text{ЕРДФ}], \quad (2)$$

где [ЕРДФ] — концентрация комплекса рибулозодифосфата РДФ с карбоксилазой Е. Довольно вероятно (Лайск, Оя, 1974), что в фотосин-

тезирующих листьях концентрация рибулозодифосфата ниже насыщающей, так что приблизительно можем написать

$$[EPДФ] = K[РДФ]E_0, \quad (3)$$

где E_0 — общее количество карбоксилазы, K — постоянная равновесия. Из формул (2) и (3) получим

$$\frac{dP}{dC_w} = k'[РДФ]E_0. \quad (4)$$

Формула (4) показывает, что начальный наклон PC_w -кривой пропорционален произведению активности рибулозодифосфаткарбоксилазы $k'E_0$ на концентрацию рибулозодифосфата.

Материал и методика

Эксперименты были проведены на листьях осины, которые отрезались от дерева и помещались черешком в воде в листовую камеру трехканальной газометрической аппаратуры. Аппаратура и методика вычисления внутриклеточной концентрации CO_2 описаны ранее (Лайск, Оя, 1970; Laisk, Oja, 1971). Измерение PC_w -кривых производили при малом содержании кислорода в азоте, чтобы избежать фотодыхание.

Фотосинтетический аппарат листа приводили в стационарный режим при насыщающей интенсивности света и приблизительно нормальной концентрации CO_2 ($472 \text{ нг} \cdot \text{см}^{-3}$). Затем резко переходили на низкую концентрацию CO_2 ($55 \text{ нг} \cdot \text{см}^{-3}$) и через 2—3 мин при этой же концентрации понижали интенсивность света. Последующее затем изменение интенсивности ассимиляции показывает изменение начального наклона PC_w -кривой, для точного измерения которого лист находился еще в течение 1—2 мин при нулевой концентрации CO_2 , а затем переходили на нормальную концентрацию, чтобы установить плато PC_w -кривой. Таким образом осуществляли переходы от насыщающей интенсивности света на различные другие значения и было получено семейство этих кривых, измеренных при различной интенсивности света.

Результаты и обсуждение

Полученные PC_w -кривые изображены на рис. 1а. Точки на кривых представляют результаты измерений. Рис. 1б иллюстрирует зависимость начального наклона μ от интенсивности света.

Из рис. 1б видно, что начальный наклон PC_w -кривых начинает падать уже при интенсивности света ниже $10 \text{ мвт} \cdot \text{см}^{-2}$. Но из этого нельзя делать вывода, что таким же образом падает активность карбоксилазы рибулозодифосфата. Возможно, что при низких интенсивностях света скорость регенерации рибулозодифосфата уступает скорости его потребления и равновесная концентрация рибулозодифосфата падает. Чтобы проверить это, несколько изменили порядок чередования концентраций CO_2 в эксперименте. От нормальной концентрации CO_2 перешли сразу же на нулевую и интенсивность света изменили при нулевой концентрации CO_2 . Затем перешли на концентрацию $55 \text{ нг} \cdot \text{см}^{-3}$. Запись интенсивности ассимиляции с этого момента приведена на рис. 2а. Видно, что сразу после перехода на концентрацию CO_2 $55 \text{ нг} \cdot \text{см}^{-3}$ наблюдается пик интенсивности ассимиляции (точка 2), которому следует падение на стационарный уровень (точка 3). После этого перешли на насыщающую интенсивность света и измеряли начальный наклон PC_w -кривой (точки 4 и 5). Очевидно, при нулевой концентрации CO_2 , когда потребление рибулозодифосфата практически отсутствует, накапливается еще значительный фонд этого вещества, несмотря на крайне низкую интенсивность света ($0,7 \text{ мвт} \cdot \text{см}^{-2}$), но большая часть этого фонда расходуется уже в течение 3 мин после перехода на более высокую концентрацию CO_2 .

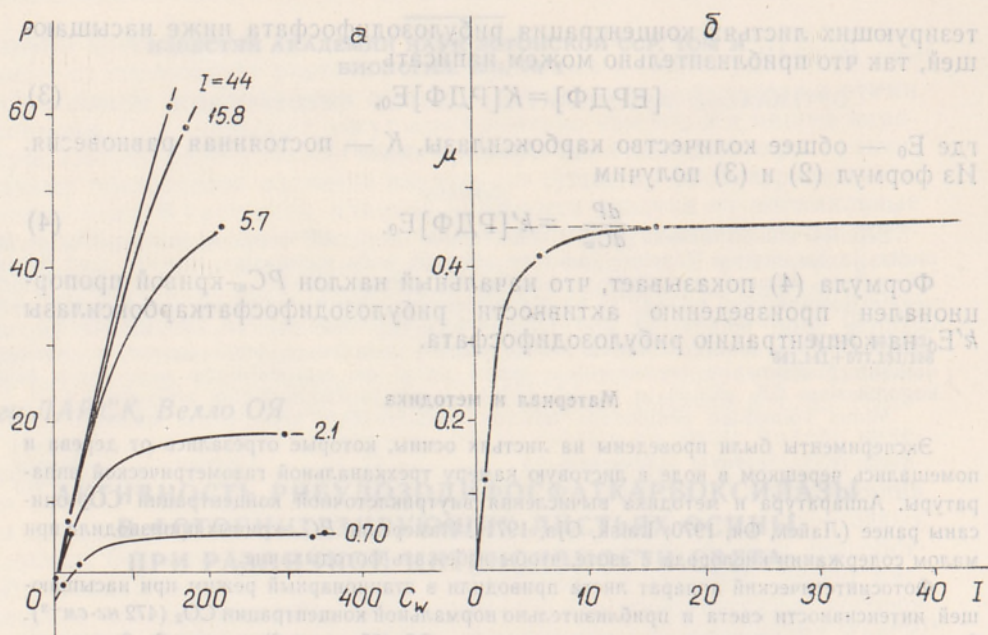


Рис. 1. PC_w -кривые листа осины при различной интенсивности света (а) и световая кривая начального наклона PC_w -кривых (б). P — интенсивность неттоассимиляции, $нг\ CO_2 \cdot см^{-2} \cdot сек^{-1}$; C_w — концентрация CO_2 в клетках мезофилла, $нг \cdot см^{-3}$; μ — начальный наклон PC_w -кривых, $см \cdot сек^{-1}$; I — плотность потока поглощенной фотосинтетически активной радиации, $мвт \cdot см^{-2}$. Газовая среда — 0,5% O_2 в N_2 , температура листа 26 °С.

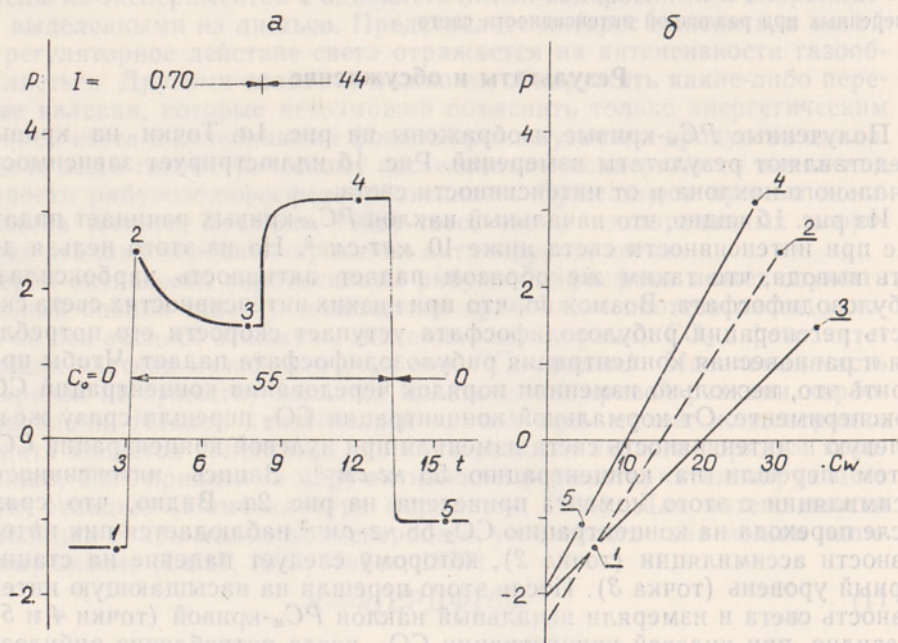


Рис. 2. Временной ход интенсивности неттоассимиляции (а) и PC_w -кривые, соответствующие выбранным точкам 1—5 (б). P — $нг\ CO_2 \cdot см^{-2} \cdot сек^{-1}$; t — мин, I — $мвт \cdot см^{-2}$, C_0 — концентрация CO_2 на входе листовой камеры, $нг \cdot см^{-3}$, 0,5% O_2 в N_2 , температура листа 26 °С.

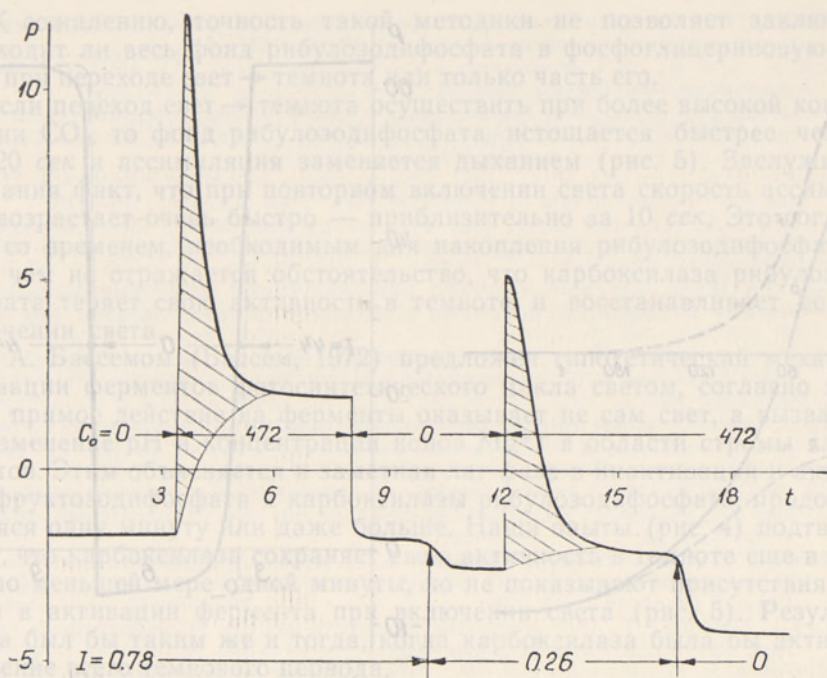


Рис. 3. Переходный процесс фотосинтеза, следующий повышению концентрации CO_2 при низкой интенсивности света. Обозначения см. на рис. 2.

На рис. 2б изображены PC_w -кривые, вычисленные по точкам 1—5 рис. 2а. Видно, что наклон кривой, соответствующей полному фонду рибулозодифосфата (точки 1 и 2), практически совпадает с наклоном кривой, измеренной при насыщающей интенсивности света (точки 4 и 5). Отсюда может быть сделан вывод, что карбоксилирующий фермент сохраняет свою активность неизменной до интенсивности света $0,7 \text{ мвт} \cdot \text{см}^{-2}$ и падение начального наклона PC_w -кривых при низких интенсивностях света обусловлено понижением концентрации рибулозодифосфата. Отчетливо виден пик интенсивности ассимиляции в другом эксперименте, в котором от нулевой концентрации перешли сразу к высокой концентрации CO_2 (рис. 3). Из рис. 3 видно, что при наличии рибулозодифосфата реакция карбоксилирования происходит активно даже при интенсивности света $0,26 \text{ мвт} \cdot \text{см}^{-2}$, которая лежит уже ниже световой компенсационной точки фотосинтеза. По заштрихованной площади на рис. 3 можно оценить фонд рибулозодифосфата, который составляет $12 \text{ нмоль} \cdot \text{см}^{-2}$ ($1 \text{ нмоль} \cdot \text{см}^{-2} = 10^{-9} \text{ моля на см}^2$) при интенсивности света $0,78 \text{ мвт} \cdot \text{см}^{-2}$ и $8,5 \text{ нмоль} \cdot \text{см}^{-2}$ при интенсивности света $0,26 \text{ мвт} \cdot \text{см}^{-2}$.

Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что в листьях высших растений активность карбоксилазы рибулозодифосфата не подлежит регулированию светом в широком диапазоне интенсивностей света — от насыщающих до светового компенсационного пункта.

Известно, что при полном выключении света ассимиляция продолжается еще в течение нескольких десятков секунд и за это время большинство рибулозодифосфата переходит в фосfogлицериновую кислоту (Petersen и др., 1966). Очевидно, что в течение этого времени карбоксилаза должна сохранять свою активность. Оказывается, что у листьев наблюдаемую ассимиляцию после выключения света можно продлить до 60 сек ,

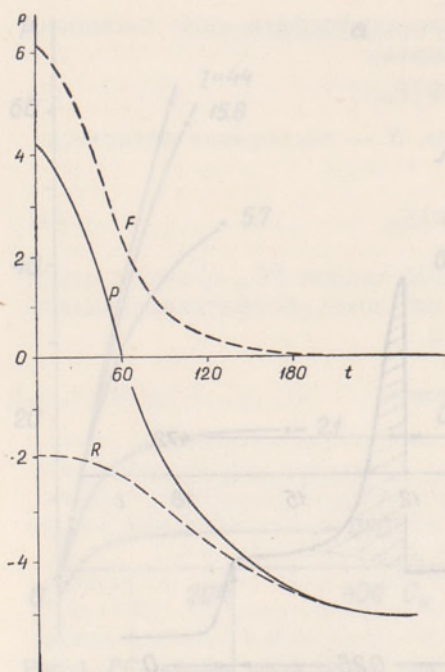


Рис. 4. Переходный процесс фотосинтеза, следующий выключению света в момент $t=0$ (сек). P — неттоассимиляция, F — чистая ассимиляция, R — дыхание, все в $\text{нг}\cdot\text{см}^{-2}\cdot\text{сек}^{-1}$. $C_0=55\text{ нг}\cdot\text{см}^{-3}$, температура листа 26°C .

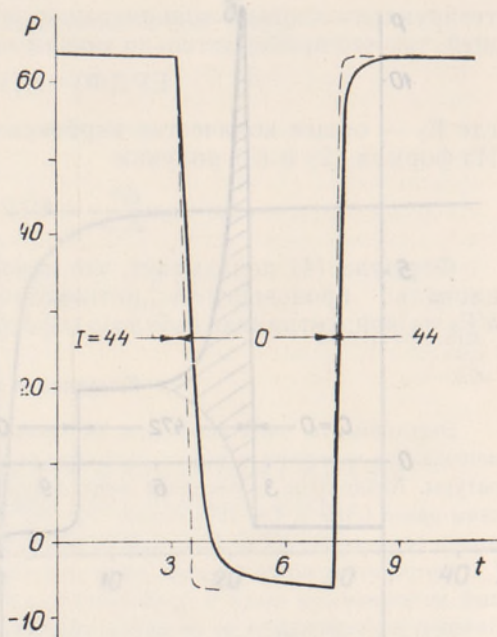


Рис. 5. Изменение интенсивности ассимиляции при переходе свет \rightarrow темнота \rightarrow свет. P — $\text{нг}\cdot\text{см}^{-2}\cdot\text{сек}$, t — мин, $C_0=472\text{ нг}\cdot\text{см}^{-3}$; 0,5% O_2 в N_2 . Прерывистая линия — реакция измерительной аппаратуры на мгновенное изменение интенсивности ассимиляции.

если накопившийся в листе рибулозодифосфат использовать очень медленно, например, при низкой концентрации CO_2 . На рис. 4 приведен временной ход изменения интенсивности видимой ассимиляции листа осины начиная с момента выключения света (сплошная кривая). Концентрация CO_2 на входе листовой камеры составляла $55\text{ нг}\cdot\text{см}^{-3}$. Для получения кривой чистой ассимиляции должно быть известно изменение интенсивности дыхания при переходе от света к темноте.

После окончания переходного процесса ($t > 180\text{ сек}$, рис. 4) интенсивность дыхания равняется полному выделению CO_2 из листа, а на свету интенсивность выделения CO_2 в межклетники может быть определена по точке пересечения PC_w -кривой (рис. 2б) с осью ординат. Переход дыхания от светового к темновому режиму осуществляется по плавной кривой, так как в интенсивности ассимиляции отсутствуют резкие скачки.

Пунктир R на рис. 4 нарисован исходя из названных соображений, а кривая чистой ассимиляции получена как разность $F=P-R$. Видно, что чистая ассимиляция продолжается в течение 100—120 сек после выключения света, а общее количество ассимилированного за это время газа составляет $360\text{ нг}\cdot\text{см}^{-2}$. Следовательно, начальный фонд рибулозодифосфата составлял $8,2\text{ нмоль}\cdot\text{см}^{-2}$.

Обстоятельство, что два различных метода оценки фонда рибулозодифосфата — переход от низкой концентрации CO_2 к высокой при низкой интенсивности света и переход от света к темноте при низкой концентрации CO_2 — дают приблизительно схожие результаты, свидетельствует о том, что объектом оценки является действительно одна и та же величина.

на. К сожалению, точность такой методики не позволяет заключить, переходит ли весь фонд рибулозодифосфата в фосфоглицериновую кислоту при переходе свет → темнота или только часть его.

Если переход свет → темнота осуществить при более высокой концентрации CO_2 , то фонд рибулозодифосфата истощается быстрее чем за 10—20 сек и ассимиляция заменяется дыханием (рис. 5). Заслуживает внимания факт, что при повторном включении света скорость ассимиляции возрастает очень быстро — приблизительно за 10 сек. Это согласуется со временем, необходимым для накопления рибулозодифосфата, и ни в чем не отражается обстоятельство, что карбоксилаза рибулозодифосфата теряет свою активность в темноте и восстанавливает ее при включении света.

Д. А. Бассемом (Бассем, 1972) предложен гипотетический механизм активации ферментов фотосинтетического цикла светом, согласно которому прямое действие на ферменты оказывает не сам свет, а вызванное им изменение рН и концентрации ионов Mg^{++} в области стромы хлоропластов. Этим объясняется и заметная лаг-фаза в инактивации и активации фруктозодифосфата и карбоксилазы рибулозодифосфата, продолжающаяся одну минуту или даже больше. Наши опыты (рис. 4) подтверждают, что карбоксилаза сохраняет свою активность в темноте еще в течение по меньшей мере одной минуты, но не показывают присутствия лаг-фазы в активации фермента при включении света (рис. 5). Результат опыта был бы таким же и тогда, когда карбоксилаза была бы активной в течение всего темнового периода.

Исходя из идеи Д. А. Бассема, следовало ожидать постепенного падения активности карбоксилазы с понижением интенсивности света, так как «протонный насос» в хлоропластах работает все слабее. То же самое должно случиться, если в активации ферментов фотосинтетического цикла участвует ферредоксин (Buchanan и др., 1967; Vuklinova, Porova, 1972). Наши опыты не подтверждают этого, так как не оказалось возможным показать значительного падения активности карбоксилазы при понижении интенсивности света от 44 до $0,7 \text{ мвт} \cdot \text{см}^{-2}$. Правда, активность фермента была измерена в условиях, где потребление АТФ и НАДФН фотосинтетическим циклом мало и не исключена возможность, что при высоких концентрациях CO_2 активность фермента меньше, чем при нулевой концентрации. Но это не отражается на интенсивности ассимиляции, поскольку в таких условиях она ограничена светом, а не реакцией карбоксилирования. Эта серия опытов не позволила обнаружить регуляторного действия света на активность карбоксилазы рибулозодифосфата в живых листьях.

Выводы

Регуляторное действие интенсивности света на активность карбоксилазы рибулозодифосфата, хотя и может иметь важное значение для расщепления процессов фотосинтеза и дыхания, не отражается в световой зависимости интенсивности ассимиляции листьев.

ЛИТЕРАТУРА

- Бассем Д. А., 1972. Регуляция путей метаболизма углерода в фотосинтезе. В сб.: Теоретические основы фотосинтетической продуктивности. М. : 117—132.
- Лайск А. Х., Оя В. М., 1970. Трехканальная газометрическая аппаратура для детального исследования CO_2 -обмена листа. Тезисы докладов Всесоюзного совещания по унификации методов и приборов для массовых измерений интенсивности фотосинтеза, 24—27 ноября. ВИР им. Н. И. Вавилова, Ленинград—Пушкин : 66—69.

- Лайск А., 1973. Математическая модель фотосинтеза и фотодыхания. Обратимая фосфорилбулокиназная реакция. Биофизика 18 (4) : 637—642.
- Лайск А., Оя В., 1974. Фотосинтез в коротких импульсах CO_2 . Реакция карбоксилирования *in vivo*. Физиол. раст. 21 (6).
- Номенклатура ферментов, 1966. Рекомендации Международного Биохимического Союза по номенклатуре и классификации ферментов, а также по единицам ферментов и символам кинетики ферментативных реакций. М.
- Bassham J. A., Jensen R. G., 1967. Photosynthesis of carbon compounds. Harvest the Sun. Photosynthesis in Plant Life. New York—London : 79—110.
- Bassham J. A., Krause G. H., 1969. Free energy changes and metabolic regulation in steady state photosynthetic carbon reduction. Biochim. Biophys. Acta 189 (2) : 207—221.
- Buchanan B. B., Kalberer P. P., Arnon D. I., 1967. Ferredoxin-activated fructose diphosphatase in isolated chloroplasts. Biochem. Biophys. Res. Comm. 29 (1) : 74—79.
- Jensen R. G., Bassham J. A., 1968. Photosynthesis by isolated chloroplasts. III Light activation of the carboxylation reaction. Biochim. Biophys. Acta 153 (1) : 227—234.
- Laisk A., 1970. A model of leaf photosynthesis and photorespiration. In: Prediction and Measurement of Photosynthetic Productivity. Proc. of the IBP/PP Technical Meeting Trebon 19—21 Sept. 1969. PUDOC, Wageningen: 295—306.
- Laisk A., Oja V., 1971. A three-channel apparatus for detailed investigation of the leaf CO_2 -exchange. Estonian Contributions to the International Biological Programme II, Tartu : 113—128.
- Pedersen, T. A., Kirk, M., Bassham J. A., 1966. Light-dark transients in levels of intermediate compounds during photosynthesis in air-adapted *Chlorella*. Physiol. Plant. 19 : 219—231.
- Preiss J., Kosuge T., 1970. Regulation of enzyme activity in photosynthetic systems. Ann. Rev. Plant Phys. 21 : 433—466.
- Vaklinova S. G., Popova L. P., 1972. Influence of ferredoxin on the activity of ribulosediphosphate and phosphoenolpyruvate carboxylases in *Scenedesmus obliquus*, maize and peas. Докл. Болг. АН 25 (2) : 263—266.

Институт астрофизики и физики атмосферы
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
30/X 1973

Agu LAISK, Vello OJA

RIBULOOSDIFOSFAATKARBOKSÜLAASI AKTIIVSUS FOTOSÜNTEESIVATES HAAVA LEHTEDES VALGUSE MITMESUGUSE INTENSIIVSUSE JUURES

Resüme

Ribuloosdifosfaadi (RuDP) karboksülaasi aktiivsuse üle otsustati niinimetatud FC_w -kövera algtoosu järgi (ordinaat $P-\text{CO}_2$ assimilatsiooni intensiivsust, abstsiss $C_w-\text{CO}_2$ kontsentratsioon fotosünteesivates mesofüllil rakkudes). Kuigi algtoos valguse väga väikeste intensiivsuste puhul langeb, võib assimilatsiooni üleminekuprotsesside (joon. 2, 3) põhjal näidata, et see on tingitud RuDP fondi langusest, kusjuures karboksülaasi aktiivsust ei muutu.

Süsihappegaasi assimilatsioon jätkub kuni 100 sekundi jooksul pärast valguse väljalülitamist (joon. 4) ja algab uuesti 10 sekundi jooksul pärast valguse sisselülitamist (joon. 5). Assimilatsiooni ajal peab ka RuDP karboksülaas aktiivne olema.

Neid tulemusi on raske seletada olemasolevate hüpoteesidega, mille kohaselt fotosünteesi tsükli fermente aktiivsust reguleerib valguse toimel töötav «protonpump» pH ja Mg^{++} ionide kontsentratsiooni kaudu kloroplastide stroomas või siis valguse toimel taandatud ferrodoksiin.

Kui valguse intensiivsus fotosünteesivates lehtedes tõesti reguleerib ribuloosdifosfaatkarboksülaasi aktiivsust, mis on ilmselt vajalik hingamis- ja fotosünteesiprotsesside lahtisidestamiseks, siis igatahes ei avaldu see süsihappegaasi assimilatsiooni kiiruse sõltuvuses valgusest.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Astrofüüsika ja Atmosfäärifüüsika Instituut

Toimetusse saabunud
30. X 1973

Agu LAISK, Vello OJA

RIBULOSE DIPHOSPHATE CARBOXYLASE ACTIVITY IN PHOTOSYNTHESIZING ASPEN LEAVES AT VARYING LIGHT INTENSITIES

Summary

The ribulosediphosphate (RuDP) carboxylase activity was evaluated from the initial slope of the so called PC_w -curves (Fig. 1, ordinate P — net assimilation rate, abscissa C_w — CO_2 -concentration in photosynthesizing mesophyll cells of the leaf). In spite of the fact that the initial slope decreases under low light intensities, on the basis of the transient processes of assimilation (Figs. 2, 3) it is possible to conclude that the reason for this is a decrease of the pool of ribulosediphosphate. The activity of ribulosediphosphate carboxylase does not change at light intensities down to 0.7 mW cm^{-2} .

Assimilation of CO_2 continues for up to 100 seconds after turning off the light, and starts in 10 seconds after turning on the light. At the time when assimilation process is going on, the RuDP-carboxylase must be active.

It is difficult to fit these results in the current hypotheses, according to which the activity of the Calvin cycle enzymes is controlled either by a light-operated "proton pump" via pH and Mg^{++} ion concentration in chloroplast stroma, or by light-reduced ferredoxin.

If the RuDP-carboxylase activity is really light-controlled in photosynthesizing leaves, then the mode of the process is such one that it is not revealed in the light-dependence of the assimilation rate.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Astrophysics and Physics
of the Atmosphere

Received
Oct. 30, 1973