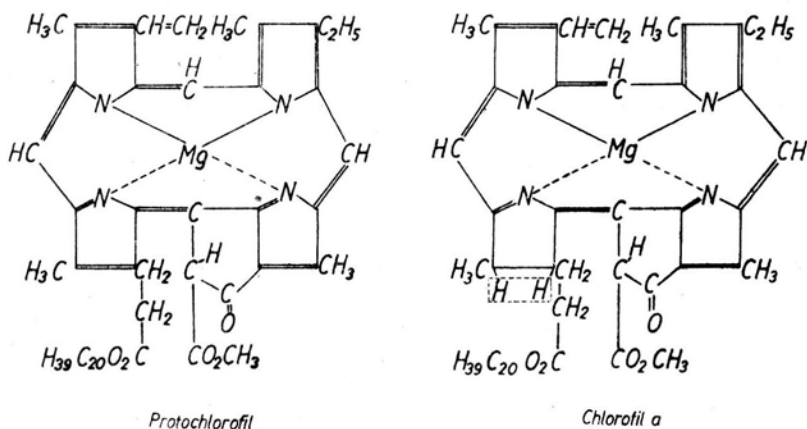


S. WIĘCKOWSKI

## FIZJOLOGICZNO-BIOCHEMICZNE STUDIA NAD KOŃCOWYMI ETAPAMI BIOSYNTETY CHLOROFILU

W roślinach etiolowanych występuje barwik, który na świetle przekształca się w chlorofil *a*. O istnieniu tego barwika wiadano już w XIX wieku (Preisser 1844, Sachs 1859); różni badacze różnie go zresztą nazywali, np. leukofilem, chlorofozem, etioliną, protofiliną i in. (patrz Smith i Young 1956). Obecnie przyjęła się nazwa «protochlorofil», która została zaproponowana przez Monteverdego w roku 1893.

Timirjazew był jednym z pierwszych, który badał powstawanie chlorofilu metodą spektroskopową. Monteverde i Lubimenko (1909, 1911) zwrócili uwagę, że protochlorofil w żywej tkance posiada inne właściwości niż w rozpuszczalnikach organicznych. Formę barwika występującego w komórce nieuszkodzonej nazwali oni chlorofilogenem. Spośród późniejszych badaczy zajmujących się protochlorofilem i jego dalszymi przemianami należy wymienić jeszcze Noacka i Kiesslinga oraz Seybolda i Eglego. Zagadnienie to jest obecnie w centrum



Rys. 1. Wzory chemiczne: protochlorofilu i chlorofilu *a*. We wzorze chlorofilu *a* przyłączone wodory w procesie fotoredukcji zaznaczono prostokątem (linia przerywana)

zainteresowania w wielu pracowniach, np. w Instytucie Biochemii Akademii Nauk ZSSR w Moskwie (Krasnowsky i jego współpracownicy), w Instytucie Biologii BSSR w Mińsku (Godniev, Shlyk i ich współpracownicy), w pracowni Biologii Instytutu Carnegiego w Stanford w USA (French, Smith i in.), w Instytucie Fizjologii Roślin Uniwersytetu w Göteborgu (Virgin) i w szeregu innych pracowniach.

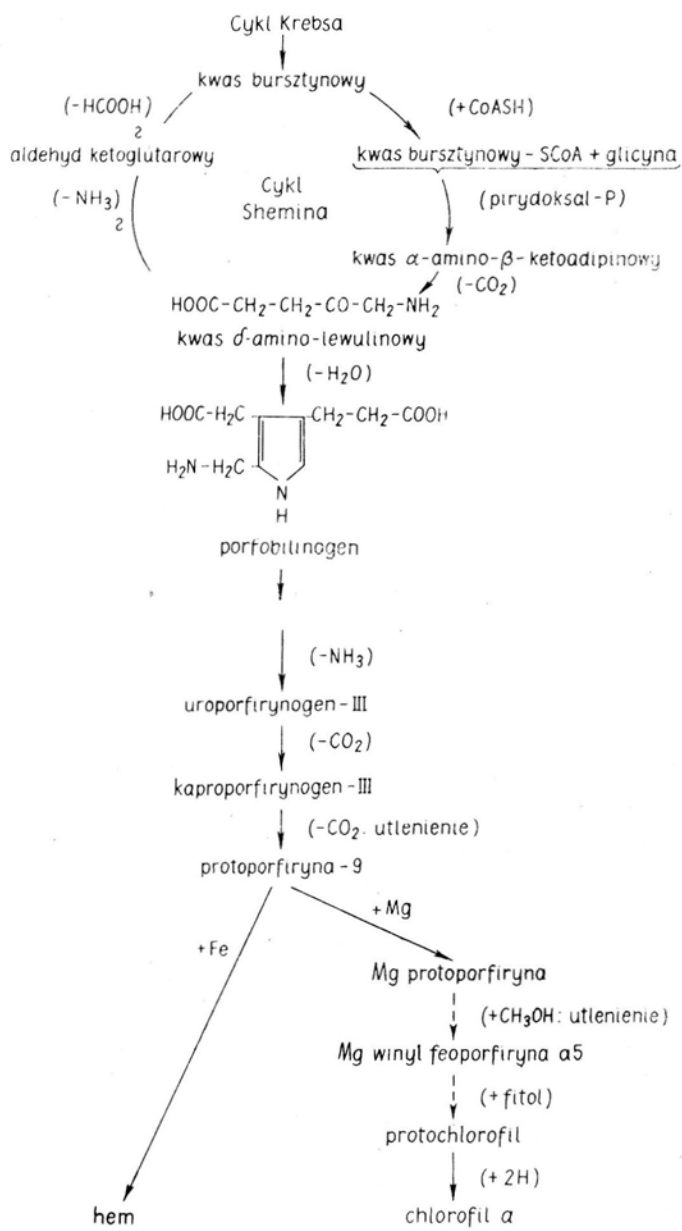
H. Fischer ze swoimi współpracownikami (patrz Fischer i Oestreicher 1940) wykazał, że drobina protochlorofilu ma budowę chemiczną bardzo podobną do drobiny chlorofilu *a*; jest jedynie uboższa o dwa atomy wodoru i posiada jedno podwójne wiązanie więcej (rys. 1). Jak wykażemy dalej w roślinach etiolowanych (i w pewnych przypadkach nie etiolowanych) może występować związek(i) o strukturze chemicznej podobnej do protochlorofilu (ale nie identycznej), który zdolny jest także do dalszych przemian w chlorofil *a*. Niektórzy badacze pod pojęciem protochlorofilu rozumieją każdy związek tworzący się w roślinach hodowanych w ciemności, z którego może powstać chlorofil *a*.

### Powstawanie i występowanie protochlorofilu

Jesteśmy jeszcze dalecy od dokładnego poznania wszystkich etapów pośrednich biosyntezy protochlorofilu. Niemniej jednak niektóre z nich zostały już dość dokładnie poznane i można przynajmniej w przybliżeniu odtworzyć główny obraz biosyntezy tego barwika. Według Granicka (1961) schematycznie przedstawia się on jak zaznaczono na str. 5.

Początkowe etapy są wspólne dla wielu związków mających układ porfinowy, które występują zarówno w świecie roślinnym jak i zwierzęcym (cytochromy, oksydaza cytochromowa, katalaza i in.). Widzimy, że związkami wyjściowymi są: kwas bursztynowy w połączeniu z koenzymem A i glicyna. Kwas bursztynowy łączy więc ten łańcuch przemian z cyklem kwasów dwu- i trójkarboksylowych (cyklem Krebsa). Nie wdając się w szczegóły przedstawionego schematu zaznaczymy tylko, że nie zawsze wymienione związki pośrednie przechodzą, według zaznaczonej kolejności, bezpośrednio jeden w drugi. Pomiędzy niektórymi z nich muszą istnieć jeszcze etapy pośrednie, które dotychczas nie zostały jednak poznane. Duże zasługi w poznaniu chemizmu syntezy związków mających układ porfinowy położyły dwie szkoły amerykańskie, mianowicie Shemina i Granicka. Shemin prowadził swoje badania na materiale zwierzęcym, natomiast Granickowi udało się wyekstrahować niektóre związki pośrednie z komórek *Chlorella*, zwłaszcza ze sztucznie otrzymanych mutantów mających zachwianą normalną drogę biosyntezy protochlorofilu. Związki pośrednie, które nie ulegały dalszej przemianie, nagromadzały się w większych, wykrywalnych ilościach.

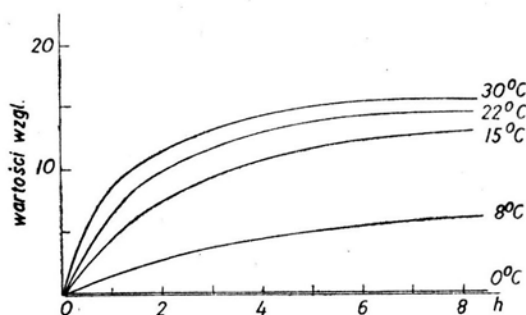
Protochlorofil powstaje więc jako produkt całego szeregu reakcji o charakterze enzymatycznym i nagromadza się w etiolowanych roślinach, ponieważ jego dalsze przemiany uzależnione są od reakcji fotochemicznych. W nasionach większości



roślin nie występuje on, lecz tworzy się dopiero w czasie ich kiełkowania (Smith i Yang 1956). W etiolowanych roślinach występuje w stosunkowo małych ilościach, np. w siewkach kukurydzy w ilości ok. 0.04 mg/g suchej masy (Koski 1949, cyt. za Eglem 1960). W porównaniu z ilością chlorofilu, jaka może nagromadzić się w tej samej jednostce odniesienia, stanowi to wielkość rzędu 0,1%. Ilości te uzależnione są zresztą od czynników genetycznych (Koski 1949), troficznych (np. odcięcie

dopływu glukozy lub sacharozy z liścieni lub z otoczenia do liści w znacznym stopniu zmniejsza akumulację protochlorofilu — Wolff i Price 1960) i szeregu czynników zewnętrznych, które omówione będą w dalszej części.

Protochlorofil tworzy się także w roślinach hodowanych na świetle, lecz nie nagromadza się w nich w wykrywalnych ilościach ponieważ szybko przechodzi w chlorofil *a* (Litwin *et al.* 1959). Przeniesienie roślin ze światła do ciemności momentalnie przerywa, u większości roślin, powstawanie chlorofilu *a*, natomiast nie zmniejsza tempa syntezy protochlorofilu. Według Virginia (1955b) regeneracja protochlorofilu w liściach jęczmienia odbywa się w ciągu pierwszych mniej więcej 8 godzin (rys. 2); najszybciej w temperaturze 30°C, natomiast w 0°C jest kompletnie zahamowana. Ponadto autor ten wykazał, że zmiany temperatury



Rys. 2. Wpływ temperatury na akumulację protochlorofilu w liściach jęczmienia wtórnie przebywających w ciemności. Odcięte — czas w godzinach, rzędne — ilość protochlorofilu w wartościach względnych (wg. Virginia 1955b)

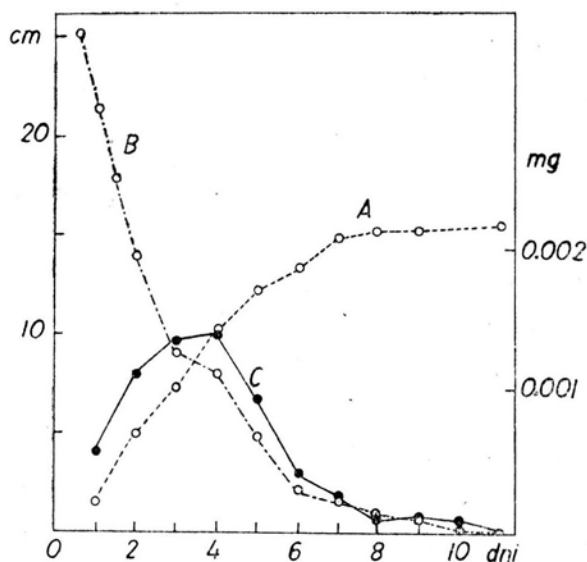
w przedziale 0—15°C wywierają większy wpływ na szybkość powstawania protochlorofilu niż zmiany w zakresie 15—30°C. W podobny sposób wpływ ten zaznacza się w liściach pszenicy (Virgin 1961a). Wtórna akumulacja jest tym intensywniejsza im liście są młodsze (rys. 3); nie stwierdzono jej natomiast w liściach, które zakończyły swój wzrost (Virgin 1961a).

Protochlorofil może powstawać w zupełnej ciemności, lecz światło stymuluje jego syntezę. Wyraża się to faktem, że nawet po krótkich impulsach świetlnych nagromadza się w większych ilościach (Virgin 1958, Wolff *et al.* 1957, Litwin *et al.* 1959, Madsen 1962); na przykład wg Madsena (1962) regeneracja ilości protochlorofilu, które przeszły w chlorofil *a* podczas krótkiego impulsu świetlnego (1/1000 sek.), odbywa się w liściach pszenicy w ciągu pierwszych 12—13 min., a w liściach jęczmienia w ciągu 19 min. (w temperaturze 20°C). Natomiast po 1 godzinie hodowli w ciemności po impulsie świetlnym tworzy się dwa razy więcej protochlorofilu w porównaniu z ilością wytwarzaną w roślinach hodowanych cały czas w ciemności.

Wyniki badań z ostatnich kilkunastu lat wskazują, że przynajmniej w niektórych roślinach etiolowanych, jeżeli nie we wszystkich, obok właściwego proto-

chlorofilu, występuje także protochlorofilid (Mg winyl feoporfiryna a5) — protochlorofil pozbawiony fitolu. Istnienie tych dwóch barwników w etiolowanych siewkach jęczmienia wykazał po raz pierwszy Löffler (1955). Według tego autora po oświetleniu protochlorofil ma przemieniać się w chlorofil *a*, natomiast protochlorofilid w chlorofilid *a*. Podobne wyniki otrzymali później Wolff i Price (1957) i Smith (1958, cyt. za Virginem 1960). Według Smitha w etiolowanych liściach fasoli protochlorofil stanowi jedynie 20% ogólnej ilości barwników ulegających przemianie po oświetleniu. Natomiast z cytowanej pracy Wolffa i Price'a wynika, że w liściach fasoli, w pierwszych minutach oświetlenia, występuje praktycznie tylko chlorofilid *a*. Dopiero po pewnym czasie przemienia się on w chlorofil *a* być może przy udziale chlorofilazy (Wolff i Price 1956).

Shibata (1957) stwierdził także występowanie dwóch form protochlorofilu w roślinach etiolowanych, z tym, że przy udziale światła tylko jedna forma ma być zdolna do przemiany w chlorofil *a*. Wyróżnił on tzw. formę aktywną (zdolną przemienić się w chlorofil *a*) i formę nieaktywną (niezdolną do dalszych przemian). W żywych liściach pierwsza posiada maksimum absorpcji w czerwonej części widma przy 650 m $\mu$ , a druga przy 636 m $\mu$ . Ponieważ nie można było wyróżnić tych form w roztworach rozpuszczalników organicznych przypuszczano, że różnią się one między sobą dołączoną komponentą białkową. Virgin (1960) jednak rozdzielił je na bibule chromatograficznej i wykazał, stosując odpowiednio czułe



Rys. 3. Powstawanie protochlorofilu podczas pięciogodzinnego przebywania w ciemności zielonych liści pszenicy różnego wielku. Temperatura 22°C A — długość liści w cm (lewa skala); B — protochlorofil w mg/g świeżej masy (prawa skala); C — protochlorofil w mg/10 liści (prawa skala) (wg Virginia 1961a)

metody, pewne różnice we właściwościach tych barwików znajdujących się nawet w roztworach rozpuszczalników organicznych, np. maksimum fluorescencji formy aktywnej jest przesunięte w kierunku fal krótszych o około 3 m $\mu$ . Na podstawie tych badań dochodzi on do wniosku, że formą aktywną jest przypuszczalnie protochlorofilid, a formą nieaktywną właściwy protochlorofil. Rola formy nieaktywnej byłaby ciągle jeszcze niewyjaśniona.

Również w roślinach nie etiolowanych ma odbywać się fotoredukcja protochlorofilidu do chlorofilidu *a* (Shlyk *et al.* 1961). Fotoredukcja byłaby więc nie ostatnim etapem biosyntezy chlorofilu *a*, lecz przedostatnim. Przyłączenie bowiem fitolu do powstałego na świetle chlorofilidu *a* może zachodzić równie dobrze w ciemności.

Większe ilości protochlorofilu wykryto także w wewnętrznych osłonkach nasion dyni (Monteverde i Lubimenko 1909). Noack i Kiessling (1929) stwierdzili, że widmo absorpcyjne barwiku z tych osłonek jest bardzo podobne do widma absorpcyjnego protochlorofilu z etiolowanych liści i dlatego wyciągnęli wniosek, że protochlorofile z tych dwóch źródeł są identyczne. Protochlorofil z osłonek nasion jest jednak niezdolny przemienić się w chlorofil *a* przy udziale światła. Nie udało się również wykazać tej przemiany przez potraktowanie osłonek nasion dyni odpowiednio przygotowanym wyciągiem z roślin etiolowanych (Krasnowsky *et al.* 1953). Inaka i Shibata (1960) porównywali *in vivo* i *in vitro* widma absorpcyjne barwików z wewnętrznych osłonek nasion trzech gatunków dyni (*Cucurbita pepo*, *C. maxima* i *C. moschata*) i stwierdzili, że nie są one identyczne we wszystkich trzech przypadkach. Widma absorpcyjne *C. pepo* i *C. maxima* różniły się znacznie od analogicznych widm *C. moschata*. Dochodzą oni do wniosku, zwłaszcza na podstawie położenia głównych maksimów absorpcji, że w pierwszych dwóch gatunkach występuje głównie protochlorofil albo (i) protochlorofilid (obecność względnie nieobecność fitolu nie wpływa w zasadniczy sposób na wygląd widm absorpcyjnych) z małą domieszką winyl-feoporfiryny a5 (chlorofilidu pozbawionego Mg). Natomiast w osłonkach nasion *C. moschata* głównym barwikiem jest winyl-feoporfiryna a5 a śladowym protochlorofil albo (i) protochlorofilid.

Istnienie w wewnętrznych osłonkach nasion dyni kilku form barwików podobnych budową do protochlorofilu wykazali także Sudyina i Lozovaya (1961). Według tych autorów barwiki te nie różnią się między sobą widmami absorpcyjnymi. Stwierdzili oni również, że zawartość tych barwików wzrasta w czasie dojrzewania nasion, oraz że w nasionach niedojrzałych występują ślady chlorofilu *a*, które jednak zanikają w ostatniej fazie dojrzewania.

Seybold i Egle (1939) oraz Seybold (1949) również rozdzielili, metodą chromatograficzną, barwiki zielone z osłonek nasion dyni na dwie główne frakcje. Autorzy ci uważają jednak, że w badanym materiale występują: protochlorofil *a* i protochlorofil *b* — bezpośrednie prekursory chlorofilu *a* i *b*.

Być może przynajmniej jedna z form protochlorofilu występująca w wewnętrznych osłonkach nasion dyni jest identyczna z nieaktywną formą protochlorofilu z etiolowanych liści.

Nasuwa się teraz pytanie, czy protochlorofil może występować także w organizmach, które nie tworzą chlorofilu *a* (bakterie zdolne do fotosyntezy). Udało się Stanierowi i Smithowi (1959) uzyskać mutantą bakterii purpurowej *Rhodospseudomonas sphaeroides*, który zamiast bakteriochlorofilu zawierał barwik o właściwościach podobnych do protochlorofilu. Widmem absorpcyjnym i położeniem maksimum absorpcji barwik ten przypominał raczej protochlorofil z osłonek nasion dyni niż protochlorofil z etiolowanych liści; jednak były większe różnice w ich tzw. liczbie HCl. Na podstawie wartości tej liczby można sądzić o ilości protochlorofilidu, wzgl. pochodnej, lecz bez dołączonego fitolu. Z innych bakterii nie udało się dotychczas wyizolować analogicznego barwika.

### Przemiana protochlorofilu w chlorofil *a*

Po oświetleniu roślin etiolowanych protochlorofil przechodzi w chlorofil *a* (dokładnie protochlorofilid w chlorofilid *a*). Przemiana ta odbywa się tylko w roślinach nieuszkodzonych lub w specjalny sposób przygotowanych roztworach koloidalnych. Nie zachodzi natomiast w rozpuszczalnikach organicznych. Ponieważ rozpuszczalniki organiczne rozbijają kompleks barwik-białko, należy wnioskować, że protochlorofil jest zdolny przejść w chlorofil *a* tylko wtedy, jeżeli jest połączony z komponentą białkową. Zresztą już analiza właściwości fizyko-chemicznych zarówno protochlorofilu jak i chlorofilu *a* wskazuje, że barwiki te muszą występować w rozpuszczalnikach organicznych w innej postaci niż w nieuszkodzonej komórce czy w wodnych roztworach koloidalnych.

W badaniach nad przemianą protochlorofilu w chlorofil *a* stosuje się dwie różne procedury:

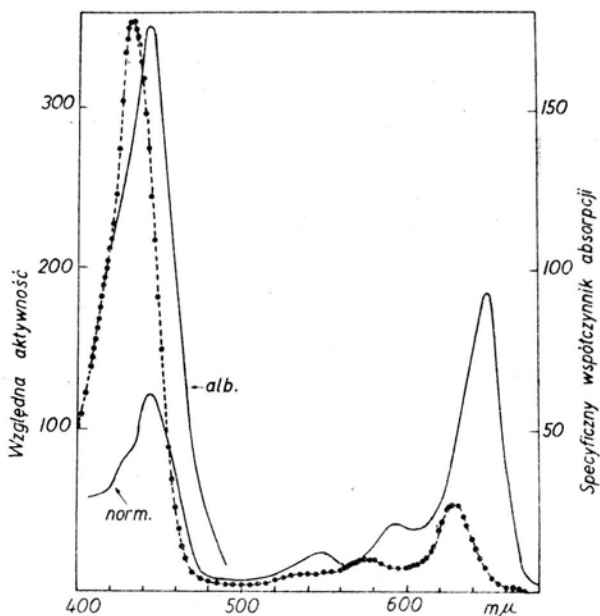
1. porównuje się skład i właściwości barwików wyekstrahowanych rozpuszczalnikami organicznymi (najczęściej acetonem) z rośliny przed i po oświetleniu,
2. analizuje się zmiany spektralne zachodzące podczas oświetlenia bądź to w liściach nieuszkodzonych, bądź też w specjalny sposób przygotowanych roztworach koloidalnych. Przeprowadza się analizę widma w czerwieni ponieważ tylko ten zakres nie jest absorbowany przez towarzyszące zawsze karotenoidy. Roztwory koloidalne mogą być mniej lub bardziej dokładnie oczyszczone.

Powstanie drobiny chlorofilu *a* jest wynikiem przyłączenia dwóch wodorów do drobiny protochlorofilu kosztem likwidacji podwójnego wiązania. Przyłączenie tych wodorów odbywa się przy udziale światła. Mówimy po prostu, że przy udziale światła następuje redukcja protochlorofilu. Donator wodoru w tej fotoredukcji jest dotychczas nie znany. Przypuszczenia Röbbelena (1956), że bierze tu udział zredukowany nukleotyd fosfopirydynowy, nie zostały potwierdzone na szerszym materiale (Boardman 1962a). Jest również bardzo mało prawdopodobne, aby przemiana ta odbywała się kosztem wodoru pochodzącego bezpośrednio z wody (Smith 1954).

Spektrum czynne powstawania chlorofilu *a* (rys. 4) pokrywa się ze spektrum absorpcyjnym protochlorofilu (Frank 1946, Koski *et al.* 1951), tzn. są dwa

główne maksima: jedno w części czerwonej widma (ok. 650  $m\mu$ ) i drugie w części niebiesko-fioletowej (ok. 445  $m\mu$ ). Światło absorbowane przez barwki towarzyszące (karotenoidy, powstały chlorofil) nie jest wykorzystywane w tym procesie (Koski *et al.* 1951). W innych zakresach spektralnych przemiana ta odbywa się z mniejszym lub większym natężeniem, zależnie od stopnia absorpcji danej części widma przez protochlorofil.

Konieczność światła do przejścia protochlorofilu w chlorofil *a* sugeruje istnienie tu typowej reakcji fotochemicznej. Gdyby tak było, to przemiana ta powinna odbywać się niezależnie od temperatury. Istotnie wykazano (Smith i Beni-



Rys. 4. Porównanie aktywnego spektrum przemiany protochlorofilu w chlorofil *a* (ciągła krzywa) w normalnych (norm.) i albinotycznych (alb.) siewkach kukurydzy ze spektrum absorpcyjnym protochlorofilu w roztworze metanolu (przerywana krzywa). Widmo absorpcyjne protochlorofilu jest podobne do spektrum czynnego; są jedynie pewne przesunięcia w położeniu maksimum absorpcji (wynikają one z faktu, że spektrum czynne określono w materiale żywym, a absorpcyjne w roztworze metanolu). Aktywność światła czerwonego jest identyczna w siewkach normalnych i albinotycznych, natomiast słabsza aktywność światła niebieskiego w roślinach normalnych jest wynikiem absorpcji części tych promieni przez karotenoidy (w siewkach albinotycznych karotenoidy występują tylko w śladach) (wg Koski *et al.* 1951).

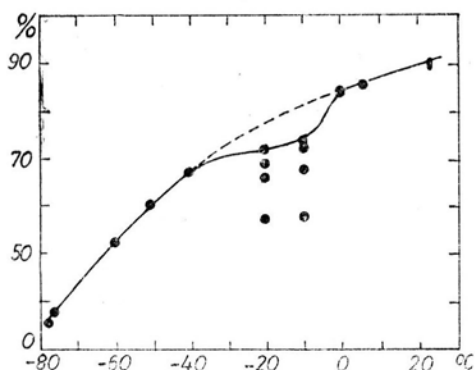
tez 1954, Boardman 1962b), że zachodzi ona w bardzo szerokim zakresie temperatur, mianowicie od około  $-70$  do  $+40^{\circ}\text{C}$  (rys. 5). Jest jednak zupełnie zahamowana w temperaturze  $-195^{\circ}\text{C}$ . Ponadto w temperaturze  $-77^{\circ}\text{C}$  tempo tej reakcji jest bardzo powolne; rośnie w miarę podwyższania temperatury. Zahamowanie w temperaturze powyżej  $+40^{\circ}\text{C}$  związane jest z denaturacją białka. Fakty te wska-



zują, że obok reakcji typowo fotochemicznej musi istnieć jakaś reakcja termochemiczna.

Z badań Smitha i Beniteza (1954) oraz Virginia (1955a) wynika, że przejście protochlorofilu w chlorofil *a* jest w zasadzie zgodne z równaniem reakcji II rzędu. Natomiast ostatnie badania Boardmana (1962b) wskazują na istnienie dwóch reakcji I rzędu różniących się między sobą szybkością przebiegu. Szybkość przemiany protochlorofilu ma być wypadkową tych dwóch reakcji i tym też tłumaczy się obserwowane odchylenia od krzywej teoretycznej.

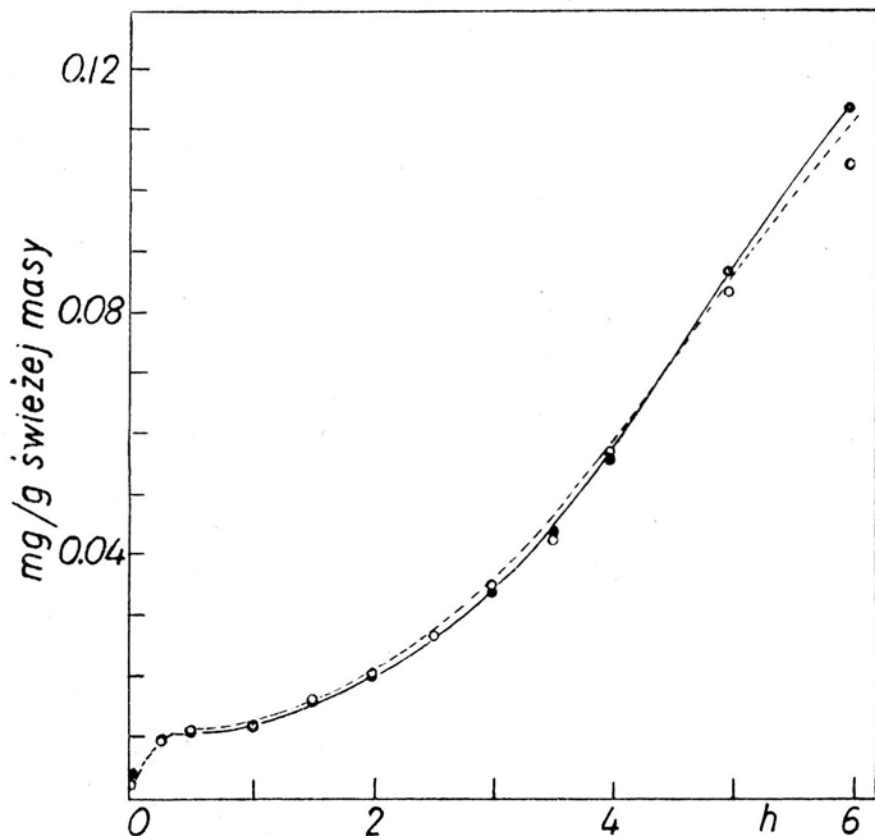
Wielu autorów wykazało (Withrow *et al.* 1956, Virgin 1958, Mitrakos 1961), że synteza chlorofilu *a*, po oświetleniu roślin etiolowanych przechodzi przez trzy



Rys. 5. Wpływ temperatury na przemianę protochlorofilu w chlorofil *a* po oświetleniu etiolowanych liści jęczmienia (10 min. oświetlenia światłem o intensywności ok. 1000 luksów). Odcięte — temperatura w °C, rzędne — % przemiany. Pewne odchylenia obserwowane w temperaturach tuż poniżej 0° są wynikiem częściowego zniszczenia tkanki przez wolno powstające kryształki lodu. (wg Smitha i Beniteza 1954).

etapy różniące się szybkością (rys. 6). W ciągu pierwszych kilku minut protochlorofil znajdujący się w tkance ulega przemianie na chlorofil *a* (rys. 7). Proces ten jest w szerokim zakresie niezależny od intensywności światła (patrz: Smith i Young 1956). W tkance roślinnej gromadzi się tym więcej chlorofilu *a* im więcej było protochlorofilu (Smith 1948). W drugim etapie trwającym około 2 godzin synteza chlorofilu *a*, jeżeli w ogóle odbywa się, jest bardzo powolna. Wreszcie w trzecim etapie akumulacja jest znów bardzo intensywna. Powstawanie chlorofilu w trzeciej fazie jest w dużym stopniu uzależnione od intensywności światła; na przykład wg Virginia (1956) w liściach pszenicy odbywa się ono tylko w zakresie intensywności światła od 0.8 luksa do około 50 000 luksów, z tym, że w miarę wzrostu intensywności powyżej 1000 luksów jest coraz wolniejsze.

Wyższe intensywności światła zmniejszają także ilość powstałego chlorofilu w pierwszej fazie. Obniżenie jednak tej akumulacji nie jest związane ze zmniejszonym tempem przemiany protochlorofilu, lecz z destrukcją części powstałego chlorofilu *a* (Madsen 1960).



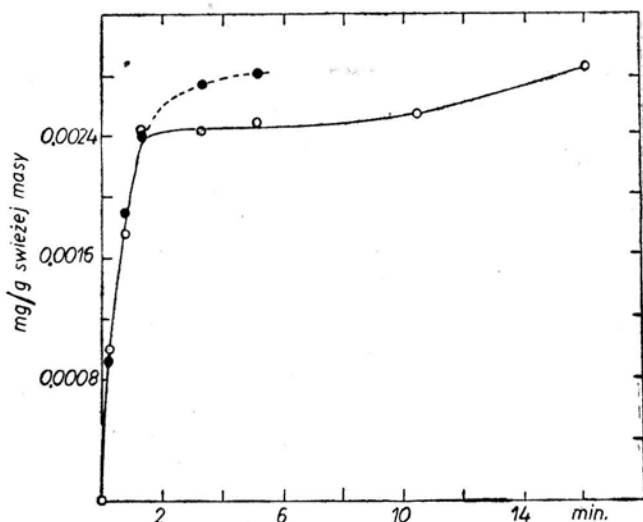
Rys. 6. Powstawanie chlorofilu *a*, w ciągu pierwszych 6 godzin oświetlenia światłem czerwonym (przerwana krzywa) i niebieskim (ciągła krzywa), w etiolowanych liściach pszenicy. Światło czerwone (610—690  $\mu\text{m}$ ) o intensywności 420  $\text{erg}/\text{cm}^2 \cdot \text{sek}$ ; światło niebieskie (410—550  $\mu\text{m}$ ) o intensywności 410  $\text{erg}/\text{cm}^2 \cdot \text{sek}$ . (wg. Virginia 1958)

Interesujące było odkrycie, że krótkie oświetlenie (około 4 min.) przerywające okres ciemności a stosowane na kilka godzin przed ciągłym oświetleniem, likwiduje, lub przynajmniej w znacznym stopniu redukuje, fazę zwolnionej syntezy chlorofilu («lag phase»). Powstawanie chlorofilu w tym przypadku jest bardzo intensywne od samego początku ciągłego oświetlenia. Wykazano dalej, że najintensywniej przebiega synteza chlorofilu, jeżeli pomiędzy 4 min. oświetleniem a ciągłym oświetleniem jest czterogodzinny okres ciemności, w przypadku siewek *Lepidium sativum* (Mitrakos 1961), lub sześciogodzinny w przypadku pszenicy (Virgin 1957). Najaktywniejsze są promienie czerwone w likwidacji tej fazy (Withrow *et al.* 1956, Virgin 1958). Według Virginia (1958) światło niebieskie (410—550  $\mu\text{m}$ ) działa około 22 $\times$  słabiej niż światło czerwone (610—690  $\mu\text{m}$ ) o tej samej intensywności. Virgin (1961) wyznaczył również aktywne spektrum

likwidacji «lag phase» w liściach pszenicy. Spektrum to posiada główne maksimum przy 660 m $\mu$  oraz mniejsze przy 540 i 600 m $\mu$  i bardzo małe przy ok. 700 m $\mu$ .

Aktywność światła czerwonego może być osłabiona krótkim oświetleniem światłem dalekiej czerwieni (Withrow *et al.* 1956, Virgin 1961b, Mitrakos 1961, Price i Klein 1961). Jednak efekt światła czerwonego (660 m $\mu$ ) nigdy nie zostaje całkowicie zniwelowany działaniem dalekiej czerwieni (730 m $\mu$ ). Ponieważ istnienie «lag phase» związane jest z bardzo powolną biosyntezą protochlorofilu lub innych prekursorów (Virgin 1958) dlatego należy wnioskować, że system R — FR (czerwień — daleka czerwień) reguluje powstawanie protochlorofilu w pewnym stopniu podobnie jak przebieg szeregu innych procesów fizjologicznych czy fotomorfotycznych, takich jak: kiełkowanie nasion, wzrost międzywęźli siewek, ruchy chloroplastów, syntezę antocyjanu itp. (patrz: Czopek 1963 i cyt. tam literatura).

Virgin *et al.* (1963) dopatrują się pewnego związku pomiędzy istnieniem trzech faz w tempie akumulacji chlorofilu *a* i zmianami zachodzącymi w strukturze chloroplastów. Plastydy w etiolowanych liściach fasoli zawierają grupy jakby «rur». Po krótkim oświetleniu «rury» te przemieniają się w «pęcherzyki», które następnie przekształcają się w pierwotne warstwy i dalej w grana. Pierwsza faza akumulacji



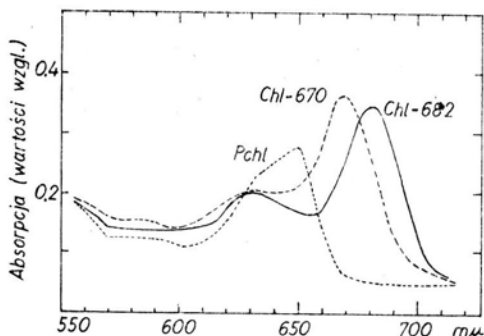
Rys. 7. Porównanie ilości powstającego chlorofilu *a* (ciągła krzywa) z ilością zanikającego protochlorofilu (przerwana krzywa) w pierwszych minutach oświetlenia etiolowanych siewek kukurydzy (wg Koski 1950)

chlorofilu pokrywa się mniej więcej z fazą przemiany «rur», natomiast trzecia faza z powstawaniem gran.

Badania przeprowadzone przez wielu autorów na liściach nie uszkodzonych oraz na wodnych lub glicerolowych roztworach koloidalnych wykazały, że przejście protochlorofilu w chlorofil *a* nie jest procesem tak prostym jak to przedstawiono

wyżej. Tak na przykład wg. Krasnowskiego i Kosobutskiej (1953) w koloidalnych roztworach z protochlorofilu, z maksimum absorpcji przy  $635\text{ m}\mu$ , powstaje w pierwszych sekundach oświetlenia chlorofil *a* z maksimum absorpcji przy  $670\text{ m}\mu$  (chl. 670), wykazujący dość intensywną fluorescencję. Forma ta, po kilku godzinach oświetlenia, przemienia się w inną formę z maksimum absorpcji w czerwonej części widma przy  $677\text{--}678\text{ m}\mu$  (chl. 677), która posiada znacznie słabszą fluorescencję. Po 16 godzinach oświetlenia chl. 670 stanowi zaledwie 3% ogólnej ilości chlorofilu. Autorzy (Krasnowsky, Kosobutskaya i Wojnowska 1953) uważają, że chl. 670 jest jedynie aktywny w fotosyntezie (jest on prawdopodobnie w postaci monomerycznej). Chl. 677 ma być nie aktywny w fotosyntezie. Występuje on w formie spolimeryzowanej, tworząc pewnego rodzaju agregaty. Dalsze badania (Litwin i Krasnowsky 1957) wskazują, że istnieją różnice pomiędzy tymi formami nie tylko w położeniu maksimum absorpcji w czerwonej części widma, ale również w położeniu głównych maksimum fluorescencji.

Również z badań Smitha (1954) wynika, że zaraz po oświetleniu nie tworzy się ostateczna forma chlorofilu. Według tego autora w pierwszych minutach oświetle-



Rys. 8. Zmiany spektralne w czerwonej części widma zachodzące *in vivo* po oświetleniu etiolowanych liści fasoli. Pchl — widmo absorpcyjne protochlorofilu (przed oświetleniem); Chl 682 — spektrum absorpcyjne chlorofilu *a* powstającego bezpośrednio po oświetleniu; Chl. 670 — spektrum absorpcyjne chlorofilu *a* w liściach przebywających 30 min. w ciemności po krótkim oświetleniu (wg Smitha, cyt. za Frenchem 1961)

nia powstaje chlorofil, który jest nie aktywny w fotosyntezie. Forma aktywna ma powstawać po nieco dłuższym oświetleniu. Wniosek ten wysuwają z faktu, że zaraz po oświetleniu synteza chlorofilu odbywa się bardzo szybko, natomiast zdolności do wydzielania tlenu wznoszą się bardzo powoli. Dopiero po kilkunastu minutach oświetlenia szybkość wydzielania tlenu wznosi się wprost proporcjonalnie do szybkości nagromadzania się chlorofilu. Dalsze badania (Shibata 1957, Smith 1957 cyt. za French 1961) wykazały, że bezpośrednio po oświetleniu etiolowanych liści fasoli tworzy się forma chlorofilu posiadająca maksimum ab-

sorpcji przy około 682  $m\mu$ , a dopiero po dalszych kilkunastu minutach forma z maksimum absorpcji przy około 670  $m\mu$  (rys. 8). Ta ostatnia tworzy się również w ciemności po krótkim oświetleniu. Być może chl. 682 jest po prostu chlorofilidem. Warto od razu wspomnieć, że mogą występować pewne zaburzenia w tej przemianie. Na przykład stwierdzono (Koski *et al* 1951, Smith *et al.* 1959), że w pewnych albinotycznych mutantach kukurydzy chl. 670 jest specjalnie fotolabilny i dlatego nie może nagromadzić się w większych ilościach, chociaż wcześniejsze etapy jego syntezy odbywają się podobnie jak w roślinach normalnych. Tak więc nietrwałość później powstającej formy chlorofilu jest przyczyną występowania albinizmu u tego mutantu. Dojrzałe zielone rośliny zawierają obie formy w różnym stosunku, dlatego wypadkowe maksimum absorpcji mieści się zazwyczaj w granicach 675—680  $m\mu$ . Według Frencha (1961) położenie maksimum absorpcji poszczególnych form może się nieco różnić w zależności od gatunku rośliny; różnice te mogą dochodzić do  $\pm 2 m\mu$ .

W wielu glonach (np. *Euglena gracilis*, *Ochromonas donica* i in.) i być może w roślinach wyższych występuje jeszcze trzecia forma chlorofilu *a* z maksimum absorpcji w czerwieni przy 695  $m\mu$  (Brown i French 1959, French 1961, Brown i French 1961, Brown 1963). Forma 695 może występować w ilości 3—20% ogólnej ilości chlorofilu i jest najbardziej fotolabilna (Brown i French 1961).

Ponieważ w ekstraktach rozpuszczalników organicznych występuje tylko jedna forma chlorofilu *a*, należy przypuszczać, że różnią się one dołączoną komponentą białkową.

Z wyżej przedstawionych prac wynika, że zaraz po oświetleniu roślin etiolowanych nie powstaje ostateczna forma chlorofilu. Wydaje się natomiast, że określenie czasu powstawania formy najbardziej aktywnej w fotosyntezie wymaga dalszych badań.

Na specjalną uwagę zasługują studia nad właściwościami barwików oraz przemiany protochlorofilu w chlorofil *a* poza komórką w specjalnie oczyszczonych wyciągach. Przemiana protochlorofil  $\rightarrow$  chlorofil *a* w odpowiednio przygotowanym roztworze (bufor fosforanowy) z etiolowanych liści była po raz pierwszy dokładnie badana przez Krasnowskiego i Kosobutskają (1952). Autorzy ci stwierdzili, że odbywa się ona w taki sam sposób jak w komórce nieuszkodzonej. Dalsze badania tego typu były podjęte między innymi w Instytucie Carnegiego przez J. H. C. Smitha i jego współpracowników.

Jak już powiedziano chlorofil *a* może powstawać tylko z protochlorofilu nie oddzielonego od komponenty białkowej. Kompleks protochlorofil-białko został nazwany przez Smitha i Younga (1956) «protochlorofil-holochrom». Jest to odpowiednik chlorofilogenu Lubimenki. Boardman (1962a) uważa jednak, że protochlorofil-holochrom w roztworze koloidalnym nawet najdokładniej oczyszczonym nie jest substancją jednolitą i dlatego proponuje, aby po prostu mówić o kompleksie protochlorofil-białko.

Do ekstrakcji używa Smith buforu glicynowego o pH 9.5 (Smith 1958). Wyciąg ten zawiera jeszcze szereg innych substancji absorbujących między innymi promienie w ultrafiolecie. W dalszych pracach (patrz: Smith 1961, Boardman 1962 a) starano się otrzymać możliwie czyste preparaty protochlorofil-holochromu. Chodziło mianowicie o uzyskanie najmniejszej jednostki, która byłaby jeszcze zdolna przejść w chlorofil *a* holochrom. W celu dokładnego oczyszczenia stosowano różne metody jak strącanie siarczanem amonu, wirowanie w ultrawirówce, elektroforezę, rozdzielanie na kolumnie chromatograficznej itp.

W oczyszczonym kompleksie protochlorofil-białko (zdolnym jeszcze do przemiany w kompleks chlorofil *a* — białko) znajdują się zawsze pewne ilości (niestełe) karotenoidów. Na podstawie wyglądu krzywych absorpcji i położenia głównych maksimów absorpcji Smith (1961) przypuszcza, że znajduje się tam ester epoksydu luteiny, luteina, izoluteina i wiolaksantyna b. Przypuszcza on także, że karotenoidy te ochraniają drobiny chlorofilu przed fotooksydacją. Kwasy nukleinowe i lipidy, jeżeli występują, to w bardzo małych ilościach (Kupke i French 1960).

Oczyszczona «drobina» protochlorofil-holochromu ma kształt sferoidalny o średnicach 218, 193 i 93 Å (Smith 1961), Fotografia spod mikroskopu elektronowego tego kompleksu podana jest w pracy Boardmana (1962 a). Na diagramach z ultrawirowania aktywne kompleksy protochlorofil-białko mają swoje wierzchołki sedymentacji przy 16—17S (Smith i Kupke 1956) lub 18S (Boardman 1962 a). Po wyznaczeniu współczynnika dyfuzji ( $2.70 \times 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/sek.) i cząstkowej objętości właściwej (0.73 ml/g) Boardman (1962 a) obliczył ciężar drobinowy protochlorofil-holochromu; ma on wynosić  $600\ 000 \pm 50\ 000$ . Wartość ta jest podobna do wcześniej obliczonej przez Smitha i Coombera (1959).

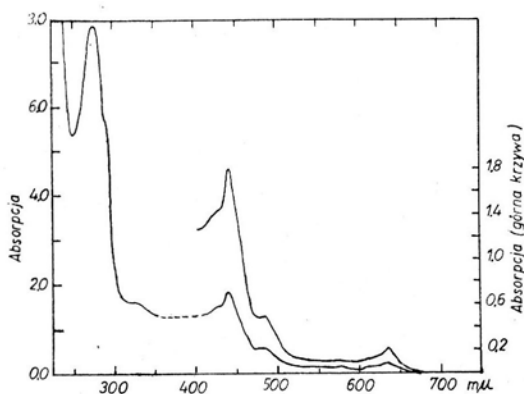
Oczyszczony kompleks protochlorofil-białko o współczynniku sedymentacji 18 S nie jest zdolny w całości przemienić się w kompleks chlorofil *a*-białko. Boardman (1962 a) rozdzielił go jeszcze (metodą elektroforezy) na kilka frakcji. Przypuszcza on, że w kompleksie tym znajduje się protochlorofil aktywny i nie aktywny. Z dalszej pracy tego samego autora (Boardman 1962b) wynika, że aktywny protochlorofil znajduje się prawdopodobnie jeszcze w dwóch formach. Obie formy są zdolne przemienić się w chlorofil *a*, lecz w niejednakowym tempie.

Spektrum absorpcyjne protochlorofil-holochromu wykazuje cztery wyraźne maksima (rys. 9): a. silna absorpcja w ultrafiolecie przy 280 m $\mu$ , b. słabsza przy 441 m $\mu$ , c. maksimum przy 485 m $\mu$  i d. przy 637,5 m $\mu$ . Po krótkim oświetleniu następuje zmiana położenia maksimów absorpcji przy 441 i 637.5 m $\mu$ . Maksimum absorpcji przy 637.5 m $\mu$  zostaje szybko przesunięte do 675 m $\mu$  (Smith i Coomber 1959, Boardman 1962). Absorpcję promieni w ultrafiolecie przypisuje się obecności tryptofanu i tyrozyny w komponencie białkowej (Smith i Coomber 1959). W tym przypadku nie tylko promieniowanie absorbowane przez protochlorofil, lecz również przez część białkową jest czynne w przemianie protochlorofil-holochrom w chlorofil *a* — holochrom. W ultrafiolecie powyżej 366 m $\mu$  protochlorofil-holochrom ulega w dużo większym stopniu przemianie niż pod działaniem krótszych długości fal (McLeod i Coomber 1960). Badano również

wpływ pH w zakresie alkalicznym na omawianą przemianę (Smith i Coomber 1960). Zmiany pH w zakresie 7—9.16 są bez większego znaczenia. Natomiast wzrost alkaliczności powyżej tego zakresu działa hamująco, np. przy pH 11.92 już po upływie 15 min. zachodzi kompletna inhibicja. Wyższa alkaliczność powoduje przede wszystkim zmiany w ultrafioletowej części widma, co jest przypuszczalnie związane z jonizacją grupy hydroksylowej tyrozyny.

Boardman (1962a) badał także wpływ różnych związków chemicznych na omawianą przemianę i stwierdził, że tylko związki powodujące denaturację białka (6 M mocznik, tioetanol w stężeniu powyżej 0.5 M i siarczan sodowo-dodecylowy) hamują ją.

Barwiki nie odłączone od komponenty białkowej mają również zdolności depolaryzacji światła spolaryzowanego (Latimer i Smith 1958, Goedheer i Smith 1959, Smith 1961). Jeżeli światło monochromatyczne, liniowo spolaryzowane pada na barwiki zdolne do fluorescencji to reemitowane światło fluorescencyjne jest w mniejszym lub większym stopniu zdepolaryzowane. Stopień depolaryzacji zależy od szeregu czynników, między innymi od wielkości drobin, stężenia tych dro-



Rys. 9. Widmo absorpcyjne protochlorofilu-holochromu. Wartości górnej krzywej przedstawiają odpowiednie wartości dolnej krzywej powiększone  $2,5 \times$  (wg Smitha i Coomera 1959).

bin i od lepkości środowiska (Geodheer i Smith 1959). Światło fluorescencyjne w żywych roślinach ulega depolaryzacji w bardzo dużym stopniu; w dużo większym niż w przypadku depolaryzacji światła fluorescencyjnego emitowanego przez barwiki znajdujące się w roztworach koloidalnych. Według Geodheera i Smitha (1959) im większa jest akumulacja chlorofilu tym większy jest stopień depolaryzacji.

### Synteza chlorofilu w ciemności

W niektórych roślinach chlorofil może powstawać w zupełnej ciemności przy udziale enzymów (patrz: Smith i Young 1956, Egle 1960). Dotyczy to szczegól-

nie niektórych glonów. Powstające w ciemności barwiki nie różnią się swoimi właściwościami od analogicznych barwików wytwarzanych przy udziale światła (Myers 1940 i in.). W tych warunkach powstawanie chlorofilu jest modyfikowane, zwłaszcza przez temperaturę i przez czynniki troficzne. Wpływ temperatury zaznacza się podobnie jak w innych procesach enzymatycznych. Spośród czynników troficznych wybitną rolę odgrywają te składniki, które są niezbędne dla rozwoju danego organizmu. Na przykład Artari (1902) stwierdził, że różne źródła węgla i azotu w różny sposób wpływają na zazielenienie się hodowanego w ciemności *Stichococcus bacillaris*. Jeżeli źródłem węgla był erytryt i dulcyt glon ten rozwijał się słabo i uzyskiwał bardzo słabe zielone zabarwienie. Również słabiej wytwarzał się chlorofil, jeżeli jako źródło azotu służył azotan potasu. Natomiast sprzyjały ogólnemu rozwojowi i syntezie chlorofilu takie źródła węgla i azotu jak mannit, maltoza, sacharoza, glukoza (węgiel) oraz pepton, asparagina, winian amonu (azot).

Od czasów Sachsa wiadomo jest także, że w liścieniach i zarodkach roślin iglastych powstaje chlorofil w ciemności. Izolowane zarodki nie zazieleniają się jednak w tych warunkach (Schmidt 1924, Bogorad 1950, Schou 1951). Natomiast uzyskują zielone zabarwienie jeżeli stykają się choćby z małym fragmentem endospermu lub liścieni (Schmidt 1924), względnie jeżeli z zewnątrz dostarczy się im glukozy lub sacharozy w nieznacznych ilościach (Schou 1951). Wyzolowanym zarodkom brak jest prawdopodobnie cukrów i pewnych innych substancji, które łatwo dyfundują z liścieni i które są niezbędne do syntezy chlorofilu bez udziału światła. Zazielenianie przy udziale enzymów odbywa się tylko w młodych siewkach, natomiast szpilki wyrosłe na gałązkach lub drzewkach przeniesionych do ciemności nie wytwarzają chlorofilu (patrz: Smith i Young 1956).

Według niektórych autorów (Seybold i Egle 1938, Röbbelen 1956, Goodwin i Owens 1947, Godniev *et al.*, 1959) przynajmniej niektóre rośliny okrytonasienne (np. liście fasoli, siewki owsa, siewki *Arabidopsis thaliana*, *Ceratophyllum demersum* i in.) też są zdolne wytwarzać nieznaczne ilości chlorofilu w zupełnej ciemności. Chlorofil w tych warunkach ma także powstawać na drodze enzymatycznej. Godniev i Tierentieva (1953) wykazali dalej, że przemiana protochlorofilu w chlorofil *a* zachodzi także bez udziału światła w etiolowanych liściach kukurydzy po infiltracji tych liści odpowiednio przygotowanym ekstraktem z wyrosłych w ciemności siewek świerka. Powstaje w tych warunkach zarówno chlorofil *a* jak i chlorofil *b*.

Przypuszcza się (Godniev *et al.* 1959), że rośliny pierwotne były zdolne wytwarzać chlorofil w ciemności. Jednak w miarę rozwoju utraciły te zdolności; pozostały one tylko w roślinach stojących niżej systematycznie i w szczątkowej formie w niektórych roślinach wyższych.

### Synteza chlorofilu *b*

Nasze wiadomości dotyczące powstawania chlorofilu *b* są bardzo skąpe. Ta słaba znajomość jest spowodowana pewnymi trudnościami w prowadzeniu badań. Badania *in vivo* nie mogą być wykonane w takim zakresie, w jakim to jest możliwe.



dla chlorofilu *a*, ponieważ nie ma okresu w powstawaniu tego barwika, w którym jego widmo absorpcyjne nie byłoby maskowane przez analogiczne widmo chlorofilu *a*. Ponadto chlorofil *b* występuje w znacznie mniejszych ilościach niż chlorofil *a* i słabiej absorbuje światło w czerwonej części widma.

Wiadomo, że w roślinach wyższych występują zawsze obydwa barwiki. Zwykle na 1 drobinę chlorofilu *b* przypadają 3—4 drobin chlorofilu *a*. Otrzymano jednak pewne mutanty jęczmienia (Highkin 1950, 1962) i *Arabidopsis* (Röbbelen 1957), które nie zawierają w ogóle chlorofilu *b*. Barwik ten nie występuje także w storczyku *Neothia* (French 1960). Nie znane są natomiast przypadki występowania tylko chlorofilu *b*.

Po oświetleniu roślin etiolowanych ślady chlorofilu *b* można wykryć dopiero po 2—3 godzinach (patrz: Blaauw-Jensen *et al.* 1950, Egle 1960). Synteza tego barwika rozpoczyna się więc znacznie później niż chlorofilu *a*. Duża wartość stosunku chlorofilu *a* do *b* po 2 godzinach oświetlenia spada jednak dość szybko do stałego poziomu (Seybold i Egle 1938, Blaauw-Jensen *et al.* 1950 i in. patrz rys. 10).

Ostatnie etapy powstawania chlorofilu *b* są nie znane. Przypuszczamy, że drogi syntezy tych dwóch barwików rozchodzą się dopiero w końcowej fazie. Godniev *et al.* (1957) i Shlyk *et al.* (1957) rozpatrują cztery możliwości:

1. chlorofil *a* i *b* powstają z różnych bezpośrednich prekursorów;
2. obydwa chlorofile powstają ze wspólnego bezpośredniego prekursora;
3. chlorofil *b* powstaje z chlorofilu *a*;
4. chlorofil *a* powstaje z chlorofilu *b*.

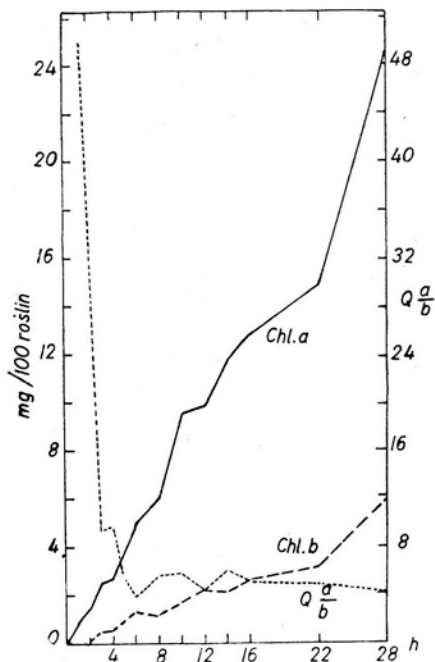
Na podstawie dotychczasowych badań dochodzą oni do wniosku, że najbardziej prawdopodobna jest możliwość 3, tzn. chlorofil *b* miałby powstawać z chlorofilu *a*. Hipotezę tę Shlyk stara się rozbudować w następnej pracy (Shlyk i Fradkin 1962). Z innej pracy (Shlyk i Stanieszewska 1962) wynika, że w ostatnim etapie biosyntezy chlorofilu *b* nie jest konieczne światło. Wykazali oni bowiem, że akumulacja tego barwika (mierzona wzrostem radioaktywności) miała miejsce w zaciemnionych liściach jęczmienia, podczas gdy zawartość chlorofilu *a* w tym czasie malała. Autorzy ci sugerują, że w tych warunkach pewne drobin chlorofilu *a* są zdolne przejść w chlorofil *b*. Wyniki Sironvala *et al.* (1961) wskazują także na możliwość fotooksydacji części drobin chlorofilu *a* do chlorofilu *b* wywołanej zmianą długości dnia. Potwierdzeniem tej hipotezy byłyby również wyniki badań Roberts'a i Perkinsa (1962) ze znacznymi pierwiastkami.

Według innego poglądu chlorofil *b* nie powstaje z chlorofilu *a*, lecz z protochlorofilu *b*. Hipoteza istnienia dwóch protochlorofilów wysunięta przez Seybolda i Eglego (Seybold i Egle 1939, Seybold 1949) nie została jednak potwierdzona na szerszym materiale.

Wzajemnej przemiany chlorofilu *a* i *b* nie wykazano przy użyciu pierwiastków radioaktywnych w komórkach *Chlorella* (Brzeski i Rücker 1960, Brzeski 1960, Della Rosa *et al.* 1953, Blass *et al.* 1959) i *Scenedesmus* (Blass *et al.* 1959).

Wyniki te potwierdzają raczej koncepcję, że drobiny chlorofilu *b* nie powstają z drobin chlorofilu *a*.

Z drugiej strony uzyskano pewne dane (Więckowski 1960, 1963, Kupke i Dorrier 1962, Kupke i Huntington 1963) wskazujące na możliwość przemiany części drobin chlorofilu *b* w chlorofil *a* po zaciemnieniu młodych rosnących liści fasoli.



Rys. 10. Powstawanie chlorofilu *a* i *b* (mierzone w mg/100 roślin) oraz zmiany stosunku chlorofilu *a* do *b* ( $Q_{a/b}$ ) po oświetleniu etiolowanych liści *Phaseolus multiflorus* (wg Seybolda i Eglego 1938).

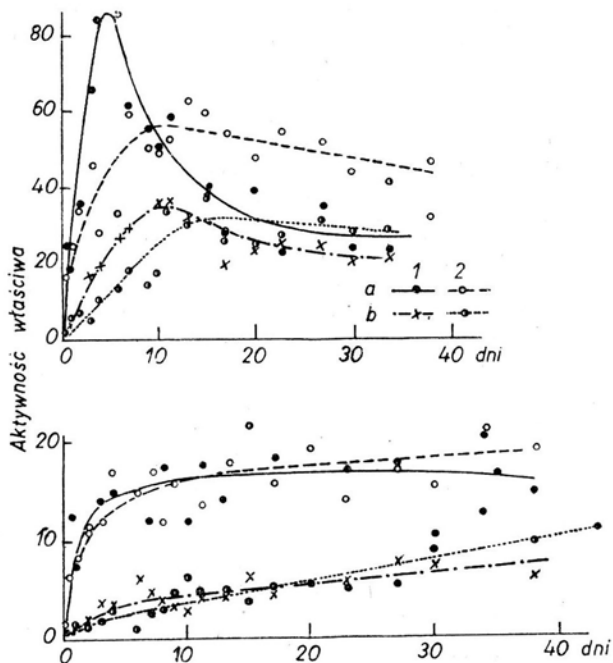
Na podstawie przedstawionych danych nie można jeszcze powiedzieć, jakie są ostatnie etapy biosyntezy chlorofilu *b*, oraz która z przedstawionych hipotez jest bliższa prawdy. Wydaje się jednak, że coraz więcej danych przemawia za pierwszym omówionym poglądem, według którego chlorofil *b* ma powstać z chlorofilu *a* (patrz również Michel-Wolwertz 1963).

### Renowacja drobin chlorofilu

Stosując znaczone pierwiastki wykazano, że drobiny chlorofilu *a* i *b* ulegają ustawicznemu odnawianiu (Roux i Husson 1952, Shlyk 1959 i cyt. tam literatura). Procesowi temu ulegają zarówno całe drobiny, jak i poszczególne części.

Jeżeli roślina pobiera przez pewien czas radioaktywny węgiel w postaci  $CO_2$ , wbudowuje go w różne związki, między innymi w chlorofil, tworzące się nie tylko *de novo*, ale już istniejące. U *Ceratophyllum demersum* maxi-

мум akumulacji radioaktywnego węgla w części fitolowej chlorofilu *a* przypada mniej więcej piątego dnia od chwili wprowadzenia tego pierwiastka do organizmu, natomiast w feoforbidzie mniej więcej 10 dnia. Odpowiednie maksima radioaktywności w fitolu i feoforbidzie chlorofilu *b* pojawiają się nieco później i są mniej więcej  $3 \times$  niższe (Shlyk *et al.* 1957, Shlyk i Kukhtenko 1961 i cyt. tam literatura).



Rys. 11. Zmiany właściwej aktywności węgla (imp./min  $\mu\text{gC}$ ) fitolu (1) i feoforbidu (2) chlorofilu *a* (a) i chlorofilu *b* (b). Górne (A) i dolne (B) partie *Ceratophyllum demersum* (wg Shlyka i Kukhtenki 1961)

Wyniki te oznaczają, że renowacja części fitolowej odbywa się szybciej niż części feoforbidowej, oraz że drobiny chlorofilu *b* ulegają wolniej renowacji niż drobiny chlorofilu *a*. Szybkość tego procesu uwarunkowana jest zresztą szeregiem czynników, np. położeniem danego organu na łodydze (rys. 11), w przypadku *Ceratophyllum demersum* w górnych częściach łodygi przebiega szybciej niż w dolnych (Shlyk *et al.* 1960). Przeciętnie od kilku do kilkunastu procent chlorofilu ma ulegać renowacji w ciągu 24 godzin (patrz: Kuturin 1956, Krasnowsky 1960).

Katedra Fizjologii Roślin Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

#### LITERATURA

- Artari A., 1902. Über die Bildung des Chlorophylls durch grüne Algen. Ber. deut. bot. Gesel. **20**, 201—207.  
 Blaauw-Jensen G., J. Komen and J. B. Thomas, 1950. On the relation between the formation of assimilatory pigments and the rate of photosynthesis in etiolated oat seedlings. Biochim. et Biophys. Acta **5**: 179—184.

- Blass U., Anderson J. M. and Calvin M., 1959. Biosynthesis and possible functional relationships among the carotenoids; and between chlorophyll *a* and chlorophyll *b*. *Plant Physiol.* **34**, 329—333.
- Boardman N. K., 1962a. Studies on a protochlorophyll-protein complex. I. Purification and molecular-weight determination. *Biochim. et Biophys. Acta* **62**, 63—79.
- 1962b. Studies on a protochlorophyll-protein complex. II. The photoconversion of protochlorophyll to chlorophyll *a* in the isolated complex. *Biochim. et Biophys. Acta* **64**, 279—293.
- Bogorad L., 1950. Factors associated with the synthesis of chlorophyll in the dark in seedlings of *Pinus jeffreyi*. *Bot. Gaz.* **111**, 221—241.
- Brown S. J., 1963. Forms of chlorophyll *a*. *Photochem. & Photobiol.* (w druku).
- and C. S. French, 1959. Absorption spectra and relative photostability of the different forms of chlorophyll in *Chlorella*. *Plant Physiol.* **34**, 305—309.
- — 1961. The long wavelength forms of chlorophyll *a*. *Biophys. J.* **1**, 539—550.
- Brzeski W., 1960. Dynamik der Incorporation der Glykokoll-Kohlenstoffatome in Chlorophyll *a* und Chlorophyll *b*. *Acta Biochem. Polon.* **7**, 351—361.
- and W. Rucker, 1960. Biosynthesis of chlorophylls *a* and *b* in *Chlorella vulgaris*. *Nature (London)* **185**, 922—923.
- Czopek M., 1963. Wpływ światła chromatycznego na kiełkowanie nasion. *Wiadomości Botaniczne* **7**, 11—23.
- Della Rosa J. R., Altman K. I. and Salomon K., 1953. The biosynthesis of chlorophyll as studied with labeled glycine and acetic acid. *J. Biol. Chem.* **202**, 771—779.
- Egle K., 1960. Biogenese des Chlorophylls, Vorstufen, Beziehung zum Hämin, Protochlorophyll. W. Ruhland (ed.) *Handbuch der Pflanzenphysiologie V/1*, 323—353. Springer-Verlag. Berlin.
- Fisher H. and Oestreicher A., 1940. Über Protochlorophyll und Vinylporphyrine. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **262**, 243—269.
- Frank S., 1946. The effectiveness of the spectrum in chlorophyll formation. *J. Gen. Physiol.*, **29**, 157—179.
- French C. S., 1960. The chlorophylls *in vivo* and *in vitro*. W. Ruhland (ed.) *Handbuch der Pflanzenphysiologie V/1*, 252—297. Springer-Verlag, Berlin.
- 1961, Light, pigments and photosynthesis. W. D. McElory and B. Glass (eds.): *Light and Life*. John Hopkins Press.
- Godniew T. N., Shlyk A. A., Lyakhovich Y. P., 1957. O reakcji pierohoda protochlorofilla w chlorofill. *Fizjol. Rast.* **4**, 393—396.
- — Rotfarb R. M., 1959, O sintezie chlorofilla w tiemnotie u pokrytonasiennych rastienii. *Fizjol. Rast.* **6**, 36—41.
- Tierientieva M. W., 1953. O prowraszczienii protochlorofilla w chlorofill w etiolirovanykh listiach kukurizi pry infiltracii ekstrakta prorostkow jeli. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* **88**, 725—727.
- Goedheer J. C., and Smith J. H. C., 1959. Fluorescence polarization and chlorophyll accumulation. *Carnegie Inst. of Wash. Year Book* **58**, 334—336.
- Goodwin R. H. and Owens O. H., 1947. The formation of chlorophyll *a* in etiolated oat seedlings. *Plant Physiol.* **22**, 197—200.
- Granick S., 1961. The chloroplasts: Inheritance, Structure, and Function. Brachet J. and Mirsky A. E., (eds.): *The cell*, t. **2**, str. 489—602. Academic Press. New York and London.
- Highkin H. R., 1950. Chlorophyll studies on barley mutants. *Plant Physiol.* **25**, 294—306.
- and Frenkel A. W., 1962. Studies of growth & metabolism of a barley mutant lacking chlorophyll *b*. *Plant Physiol.* **37**, 814—820.
- Inada Y. and Shibata K., 1960. Vinyl pheoporphyrin  $A_2$  in the inner seed coats of pumpkins. *Plant and Cell Physiol.* **1**, 311—316.
- Koski V. M., 1950. Chlorophyll formation in seedlings of *Zea mays* L. *Arch. Biochem.* **29**, 339—343.
- French C. S. and Smith J. H. C., 1951. The action spectrum for the transformation of protochlorophyll to chlorophyll *a* in normal and albino corn seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.* **31**, 1—17.
- and Smith J. H. C., 1951. Chlorophyll formation in a mutant-white seedling 3. *Arch. Biochem. Biophys.* **34**, 189—195.

- Krasnowsky A. A., 1960. The primary processes of photosynthesis in plants. *An. Rev. Plant Physiol.* **11**, 363—410.
- Kosobutskaja M., 1952. Spektralnyje isledowania sostojania chlorofilla pri jego obrazowani w rastienii i w koloidnych roztworach wieszczstwa etiolirowanych listi. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **85**, 177—180.
- — 1953. Rozlicznyje sostojania chlorofilla w listiach rastienii. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **91**, 343—346.
- — Vojnowskaja K. K., 1953. Aktywnyje i nieaktywnyje formy protochlorofilla, chlorofilla i bakteriochlorofilla w fotosintezirujuszczich organizmach. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **92**, 1201—1204.
- Kupke D. W., and Huntinton J., 1963. Chlorophyll *a* appearance in the dark in higher plants; analytical notes. *Science* **140**, 49—51.
- and Dorrier T. E., 1962. The chlorophyll *a/b* ratio of leaves in the dark. *Plant Physiol.* **37**, xiiii (suppl.).
- and French C. S., 1960. Relationship of chlorophyll to protein and lipoids; molecular and colloidal solutions. Chlorophyll units. Ruhland W., (ed.): *Handbuch der Pflanzenphysiologie t. V/1*, str. 298—322. Springer-Verlag, Berlin.
- Kutiurin V. M., 1956. K woprosu ob obnowleniu molekul chlorofilla w rastieniach. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **106**, 355—357.
- Latimer P. and Smith J. H. C., 1958. The polarization of fluorescence from the protochlorophyll holochrome. *Carnegie Inst. of Wash. Year Book* **57**, 293—295.
- Litwin F., F., Krasnowsky A. A., 1957. Isledowanie promieniutocznych stadii obrazowania chlorofilla w etiolirowanych listiach po spektrom fluorescencji. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **117**, 106—109.
- — Rikhireva G. T., 1959. Obrazowanie i prewraszczenie protochlorofilla w zielonych listiach rastienii. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **127**, 699—701.
- Löffler J. E., 1955. Precursors of protochlorophyll in etiolated barley seedlings. *Carnegie Inst. of Wash. Year Book* **54**, 159—160.
- Madsen A., 1960. Protochlorophyll/chlorophyll conversion by single flash illumination. *Physiol. Plant.* **13**, 380—384.
- 1962. Protochlorophyll/chlorophyll conversion and regeneration of protochlorophyll in etiolated leaves. *Physiol. Plant.* **15**, 815—820.
- McLeod G. C. and Coomber J., 1960. The transformation of protochlorophyll to chlorophyll *a* in ultraviolet light. *Carnegie Inst. of Wash. Year Book* **59**, 324—325.
- Michel-Wolwertz M. R., 1963. Photooxydation des pigments chlorophylliens en presence d'un pre-curseur marque. *Photochem. & Photobiol.* (w druku).
- Mitrakos K., 1961. The participation of the red far-red reaction system in chlorophyll-metabolism. *Physiol. Plant.* **14**, 497—503.
- Monteverde N. Lubimenko W., 1909. Über den grünen Farbstoff der inneren Samenhülle einiger Cucurbitacea und dessen Beziehung zum Chlorophyll. *Bull. Jardin Imp. bot. St. Petersburg* **9**, cz. 2 i 3 (cyt. za K. Eglem 1960).
- — 1911. Untersuchungen über die Chlorophyllbildung bei den Pflanzen. *Biol. Zbl.* **31**, 449—458.
- Myers J., 1940. A study of the pigments produced in darkness by certain green algae. *Plant Physiol.* **15**, 575—588.
- Noack K. and Kiessling W., 1929. Zur Entstehung des Chlorophylls und seiner Beziehung zum Blutfarbstoff. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **182**, 13—49.
- Preisser F., 1844. Über den Ursprung und die Beschaffenheit der organischen Farbstoffe und besonders über die Einwirkung des Sauerstoffes auf dieselben. *J. prakt. Chem.* **2**, 129—164.
- Price L. and Klein W. H., 1961. Red, far-red response & chlorophyll synthesis. *Plant Physiol.* **36**, 733—735.
- Roberts D. W. A. and Perkins H. J., 1962. Biosynthesis of chlorophyll from acetate 1—C<sup>14</sup> and glycine 1—C<sup>14</sup> by wheat leaves. *Can. Jour. of Biochem. and Physiol.* **40**, 973—974.
- Roux C. & Husson C., 1952. Pigments des chloroplastes et photosynthese. *Comptes-Rendus Acad. Sc.* **234**, 1573—1581.

- Röbbelen G., 1956. Über die Protochlorophyllreduktion in einer Mutante von *Arabidopsis thaliana* (L) Hsynh. *Planta* **47**, 532—546.
- 1957. Eine Blattfarbmutante ohne Chlorophyll *b* von *Arabidopsis thaliana* (L) Hsynh. *Naturwissenschaften* **9**, 288—289.
- Sachs J., 1859. Über das Vorhandensein eines farblosen Chlorophyll-Chromogens in Pflanzen-teilen, welche fähig sind, grün zu werden. *Lotos* **9**, 6—14.
- Schmidt A., 1924. Über die Chlorophyllbildung in Koniferembryo. *Bot. Arch.* **5**, 260—282.
- Schou L., 1951. On chlorophyll formation in the dark in excised embryos of *Pinus jeffreyi*. *Physiol. Plant.* **4**, 617—620.
- Seybold A., 1949. Zur Kenntnis des Protochlorophylls III. *Planta* **36**, 371—388.
- und Egle K., 1938. Lichtfeld und Blattfarbstoffe II. *Planta* **28**, 87—123.
- — 1939. Zur Kenntnis des Protochlorophylls II. *Planta* **29**, 119—128.
- Shibata K., 1957. Spectroscopic studies on chlorophyll formation in intact leaves. *J. Biochem. (Jap.)* **44**, 147—173.
- Shlyk A. A., 1959. Izuczenie processa obnowlenia chlorofilla metodom mieczonych atomow. *Problemy Fotosinteza, AN SSSR str.* 179—184.
- Fradkin I., 1962. O skorosti metabolizma chlorofilla w zielonom rastienii. *Biofizyka* **7**, 281—291.
- Godniev T. V., Rotfarb R. M., Lyakhovich Y. P., 1957. Ob osobiennostiach biosinteza dwoch komponentow chlorofilla w procesie obnowlenia. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* **113**, 1324—1327.
- Gaponenko V. I., Prudnikova I. V., Kukhtenko T. V., Lyakhovich Ya. P., Kaler V. L., 1960. Srawnitielnoje issledowanie obnowlenia chlorofilla w raznych czastiach rastienii. *Fizj. Rast.* **7**, 625—637.
- Kaler V. L., Podchufarova G. M., 1961. Protochlorophyllide in green plants, V Internat. Biochem. Congress, Moskau.
- Kukhtenko T. V., 1961. Kinetika udielnych aktivnosti ugleroda fitola i forbida chlorofillow *a* i *b* w procesie obnowlenia. *Fizj. Rast.* **8**, 526—535.
- Staniszevszkaja E. M., 1962. Tiemnowyj biosintez chlorofilla *b* w zielonom rastienii. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **144**, 226—229.
- Sironval C., Verly W. G. and Marcelle R., 1961. Radioisotopic study of chlorophyll accumulation in soybean leaves, in the conditions of a transferr from one daylength to another («Transfer-effect»). *Physiol. Plant.* **14**, 303—309.
- Smith J. H. C., 1948. Protochlorophyll, precursor of chlorophyll. *Arch. Biochem.* **19**, 449—454.
- 1954. The development of chlorophyll and oxygen-evolving power in etiolated barley leaves when illuminated. *Plant Physiol.* **29**, 143—148.
- 1958. Chlorophyll synthesis *in vivo* and *in vitro*. *Carnegie Inst. of Wash. Year Book* **57**, 287—290.
- 1961. Some physical and chemical properties of the protochlorophyll holochrome. T. W. Goodwin and Lindberg (eds.): *Biological structure and function*, t. II, str. 325—338. Academic Press, London, New York.
- and Benitez A., 1954. The effect of temperature on the conversion of protochlorophyll to chlorophyll *a* in etiolated barley leaves. *Plant Physiol.* **29**, 135—143.
- and Coomber J., 1959. Absorption spectrum of protochlorophyll holochrome. *Carnegie Inst. of Wash. Year Book* **58**, 331—334.
- — 1960. The effect of pH on the phototransformation of protochlorophyll holochrome. *Carnegie Inst. of Wash. Year Book* **59**, 325—330.
- — 1961. Chlorophyll formation, *Carnegie Inst. of Wash. Year Book* **60**, 371—374.
- Durham L. J. and Wurster Ch. F., 1959. Formation and bleaching of chlorophyll in albino corn seedlings. *Plant Physiol.* **34**, 340—345.
- and Kupke D. W., 1956. Some properties of extracted protochlorophyll holochrome. *Nature (London)* **178**, 751—752.
- and Young V. M. K., 1956. Chlorophyll formation and accumulation in plants. A. Hollaender (ed.) *Radiation Biology t. III*, str. 393—442. McGraw-Hill Book Company inc. New York.

- Stanier R. Y. and Smith J. H. C., 1959. Protochlorophyll from a purple bacterium. Carnegie Inst., of Wash. Year Book **58**, 336—338.
- Sudyina E. G. and Lozovaya G. J., 1961. Protochlorophyll of the inner coats of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds. Ukr. Bot. Zhurnal **18**, 35—44.
- Virgin I. Hemming, 1955a. The conversion of protochlorophyll to chlorophyll *a* in continuous and intermitted light. *Physiol. Plant.* **8**, 389—403.
- 1955b. Protochlorophyll formation and greening in etiolated barley leaves. *Physiol. Plant.* **8**, 630—643.
- 1956. Light-induced stomatal transpiration of etiolated wheat leaves as related to chlorophyll *a* content. *Physiol. Plant.* **9**, 482—493.
- 1957. Chlorophyll *a* content and transpiration of etiolated wheat leaves after pretreatment with a short light impulse followed by dark periods of varying lengths. *Physiol. Plant.* **10**, 445—453.
- 1958. Studies on the formation of protochlorophyll and chlorophyll *a* under varying light treatments. *Physiol. Plant.* **11**, 347—362.
- 1960. Pigment transformation in leaves of wheat after irradiation. *Physiol. Plant.* **13**, 155—164.
- 1961a. On the formation of protochlorophyll in normal green wheat leaves of varying age. *Physiol. Plant.* **14**, 384—392.
- 1961b. Action spectrum for the elimination of the lag phase in chlorophyll formation in previously dark grown leaves of wheat. *Physiol. Plant.* **14**, 439—452.
- Kahn A. and Wettstein D. V., 1963. The physiology of chlorophyll formation in relation to structural changes in chloroplasts. *Photochem. & Photobiol.* (w druku).
- Więckowski S., 1960. Daily changes in the concentration of chlorophyll in growing leaves. *Acta Soc. Bot. Polon.* **29**, 395—412.
- 1963. The relation between the growth of the leaf and the synthesis of chlorophyll in *Phaseolus vulgaris*. *Photochem. & Photobiol.* (w druku).
- Withrow R. B., Wolff J. B. and Price L., 1956. Elimination of the lag phase of chlorophyll synthesis in dark-grown bean leaves by pretreatment with low irradiances of monochromatic energy. *Plant Physiol.* **31**, XIII (suppl.).
- Wolff J. B. and Price L., 1956. The role chlorophyllase in the synthesis of chlorophyll *a* in higher plants. *Plant Physiol.* **31**, xxxi (suppl.).
- — 1957. Terminal steps of chlorophyll *a* biosynthesis in higher plants. *Arch. Biochem. Biophys.* **72**, 293—302.
- — 1960. The effect of sugars on chlorophyll biosynthesis in higher plants. *J. Biol. Chem.* **235**, 1603—1608.
- — and Withrow R. B., 1957. Stimulation of protochlorophyll synthesis in dark-grown bean leaves by irradiation with low energy. *Plant Physiol.* **32** ix (suppl.).