

ANNA FRANKIEWICZ-JÓŻKO

WZMOŻONE CIEMNIOWE WIĄZANIE CO₂ U ROŚLIN

U wielu roślin, w krótkim okresie ciemności, po wyłączeniu światła, obserwuje się wiązanie dwutlenku węgla z natężeniem znacznie przewyższającym normalne wiązanie CO₂ w ciemności. Zjawisko to nazwano „Enhancement” (En), lub wzmocnionym ciemniowym wiązaniem CO₂. Proces ten jest niezwykle interesujący, dotyczy bowiem mechanizmu fotosyntezy, a jego badanie może dostarczyć wielu cennych informacji dla wyjaśnienia szeregu zagadnień z zakresu wymiany CO₂ u roślin. Zjawisko to ma także duże znaczenie dla zrozumienia samej istoty fotosyntezy. Jest bowiem przykładem rozdziału fotosyntezy na reakcje związane z pochłanianiem energii świetlnej oraz reakcje związane z przekształcaniem CO₂. Zjawisko wzmoczonego ciemniowego wiązania CO₂ zatem, umożliwiła bezpośrednie badania nad „ciemnymi” reakcjami fotosyntezy oraz nad ich zależnością od reakcji „świetlnych” bez stosowania specjalnych metod rozdziału obu tych reakcji. Artykuł ten ma na celu omówienie wyników prac uczonych zajmujących się tym zagadnieniem.

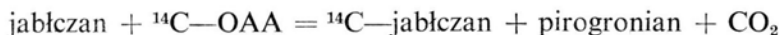
Zjawisko wzmoczonego ciemniowego wiązania CO₂ obserwowano u zielenic, sinic i krasnorostów (Benson i Calvin 1947, 1949, 1950, Fager i współ. 1950, Gaffron i Fager 1951, Tamiya i Miyachi 1955, 1957, 1960, Bassham i Kirk 1963, Hogetsu i Miyachi 1970, Togasaki i Gibbs 1963, 1967), a także u wyższych roślin typu C₄ tj. szpinaku i tytoniu (Laber i współ. 1971, Poskuta 1971). U kukurydzy tj. rośliny typu C₄, u której szlak metaboliczny węgla przebiega drogą Hatcha i Slacka (Hatch i Slack 1970) wzmoczone ciemniowe wiązanie CO₂ obserwowali Poskuta (1969) i Farineau (1971).

Produkty wzmoczonego ciemniowego wiązania CO₂ badano głównie przy zastosowaniu izotopu węgla ¹⁴C i stwierdzono, że zjawisko to ograniczone jest do reakcji karboksylacji akceptora CO₂ akumulowanego na świetle (Wilson i Calvin 1955). Tak więc, głównym produktem ciemniowego wiązania CO₂, po wyłączeniu światła, u roślin typu C₃ jest kwas 3-fosfoglicerynowy (3—PGA) powstający w wyniku karboksylacji rybulozo 1,5 dwufosforanu (RuDP) (Togasaki i Gibbs 1967, Hogetsu i Miyachi 1970, Farineau 1971, Togasaki i Botos 1971). Natomiast u roślin typu C₄ są nimi czterowęglowe kwasy dwukarboksylowe tj. szczawiooctan, jabłczan i asparaginian, powstające w wyniku karboksylacji fosfoenolopirogronianu (PEP)

(Kortschak i współ. 1965, Baldry i współ. 1969, Samejima i Miyachi 1970, Laber i współ. 1971, Stamieszkin i współ. 1972). We wszystkich tych doświadczeniach znakowanie węgla w fosforanach cukrów było nieznaczne i nigdy nie przekraczało 10% w stosunku do ogólnie włączonego ^{14}C .

Wielu badaczy stoi na stanowisku, że wzmoczone ciemniowe wiązanie CO_2 jest kontynuacją wiązania fotosyntetycznego i przebiega kosztem fotoproduktów nagromadzonych w okresie świetlnym. Niski poziom NADPH_2 i ATP w ciemności jest odpowiedzialny za ograniczoność i krótkotrwałość tego procesu (Benson i Calvin 1947, 1950, Baššham i Kirk 1963, Miyachi i Tamiya 1955, 1957). W doświadczeniach z kukurydzą przy użyciu izotopu węgla ^{14}C Samejima i Miyachi (1970) stwierdzili, że w ciemności, po wyłączeniu światła, w atmosferze pozbawionej CO_2 , gross radioaktywności ulokowane było w kwasie jabłkowym i asparaginowym, natomiast w tych samych warunkach na świetle radioaktywność gromadziła się głównie w cukrach. W doświadczeniach z inhibitorami transportu elektronów takimi jak: cjanek potasu (KCN) i dwuchlorodwumetylomocznik (DCMU) wymienieni autorzy wykazali, że przeniesienie radioaktywności z czterowęglowych kwasów dwukarboksylowych: jabłkowego i asparaginowego do cukrów wymaga energii świetlnej dostarczanej przez funkcjonujący aparat fotosyntetyczny. Togasaki i Botos (1971) stosując DCMU tj. inhibitor fotoukładu II i fotofosforylacji niecyklicznej, w doświadczeniach z *Chlamydomonas reinhardtii* stwierdzili, że w przypadku gdy komórki glonów umieszczone były w atmosferze azotu wzmoczone ciemniowe wiązanie CO_2 było całkowicie znoszone, natomiast w atmosferze wodoru zjawisko to zachodziło z normalnym natężeniem. Autorzy sugerują, że odbywało się to dzięki „sile redukcyjnej” której źródłem był wodór. U mutantów z uszkodzonym transportem elektronów (En) było znoszone. Na podstawie wyników tych doświadczeń badacze wnioskują, że zjawisko wzmoczonego ciemniowego wiązania CO_2 wymaga obecności „siły redukcyjnej” pochodzącej z działającego fotosyntetycznego transportu elektronów. Z drugiej strony, Hogetsu i Miyachi (1970) zauważyli, że dodatek ATP i NADPH_2 pod koniec okresu świetlnego nie zwiększał, w ciemności, włączania ^{14}C do fosforanów cukrów. Również nasze wstępne doświadczenia (dane nieopublikowane) wykazały, że brak jest wyraźnej zależności pomiędzy ciemniowym wiązaniem CO_2 a natężeniem fotosyntezy. Wszakże, wydaje się, że na świetle może istnieć niewielka pula ATP i zredukowanych nukleotydów, która jest w dużym stopniu niezależna od natężenia światła i bardzo szybko ulega wysyceniu. Może to być przyczyną braku wyraźnego wpływu natężenia światła na (En). Urbach i współ. (1965) zaobserwowali przemieszczanie się PGA pomiędzy cytoplazmą a aparatem fotosyntetycznym. Badacze ci sugerują, że w chloroplaście istnieje określona pula PGA pozostająca w równowadze z pulą cytoplazmatyczną i że równowaga ta jest niezbędna dla aktywacji dalszych przemian PGA do fosforanów cukrów. „Siła redukcyjna” potrzebna do tego procesu, w ciemności, może być według autorów czerpana z przemian glikolitycznych węglowodanów. Pedersen i współ. (1966a) stwierdzili, że poziom nieorganicznych fosforanów (PPi) nie ulegał zmianom przy zastosowaniu inhibitorów fotofosforylacji. Pedersen i współ. (1966b) badając między innymi wpływ zmian światło-ciemność na poziom PPi sugerują, że w ciem-

ności tworzone są nieorganiczne fosforany lub ich biochemiczne prekursorsy. PPI zatem, mogłyby być źródłem fosforu dla ATP niezbędnego w procesie wiązania CO_2 w ciemności. Znakowanie jabłczanu, u roślin C_4 , po wyłączeniu światła, Farineau (1971) tłumaczy istnieniem tzw. reakcji „wymennych”. Według tego autora kwas jabłkowy może bezpośrednio reagować z produktem karboksylacji fosfoenolopirogronianu tj. szczawiooctanem (OAA) zgodnie z reakcją:



bez udziału, niedostępnej w ciemności, „siły redukcyjnej”.

Wielu badaczy donosiło o świetlnej aktywacji różnych enzymów fotosyntetycznych: karboksylazy RuDP (Pedersen i współ. 1966b), rybulozo-5-fosfokinazy (Ziegler i współ. 1971, Wildner i Zilg 1971), karboksylazy PEP (Nagy i współ. 1971). W doświadczeniach z izolowanymi chloroplastami trzciny cukrowej Baldry i współ. (1969) stwierdzili świetlną aktywację karboksylazy PEP oraz bardzo szybką fotoredukcję szczawiooctanu do jabłczanu. Pedersen i współ. (1966b) w doświadczeniach z *Chlorella* wykazali, że w przemiennych okresach światło-ciemność zmienia się aktywność wielu enzymów dopuszczając do działania fotosyntezę lub zachodzącą w ciemności glikolizę. Tak więc, zgodnie z sugestią Hogetsu i Miyachi (1970), inaktywacja enzymów biorących udział w wiązaniu CO_2 uniemożliwiałaby dalszy przebieg reakcji fotosyntetycznych w ciemności i byłaby odpowiedzialna za ograniczoność tego procesu. Okres około 4 minut (Togasaki i Gibbs 1967) lub 2 minut (Stamieszkin i współ. 1972) trwania (En) mógłby zatem odpowiadać okresowi „życia” enzymów biorących udział w wiązaniu dwutlenku węgla w ciemności. Wydaje się także, że jakość światła mogłaby wpływać na (En) poprzez działanie na aktywację enzymów biorących udział w ciemniowym wzmożonym wiązaniu CO_2 . Potwierdzeniem tego przypuszczenia mogą być prace Woskreszeńskiej (1971) i Wildnera i Zilga (1971). Ci ostatni stwierdzili maksymalną aktywację karboksylazy RuDP w świetle krótkofalowym.

Liczni badacze wykazali, że (En) silnie zależy od koncentracji tlenu i podobnie jak fotosynteza wykazuje typowy efekt Warburga, zarówno u glonów (Tamiya i Miyachi 1955, 1957, Katoh 1958), jak i u tytoniu (Poskuta 1971) i kukurydzy (Poskuta 1969). Mechanizm działania tlenu na fotosyntezę wyjaśniano hamującym wpływem tego czynnika na reakcje świetlne fotosyntezy (Miyachi 1955, Hirokawa 1958, Björkman 1966) lub na reakcje ciemniowego włączania CO_2 (Bassham i Kirk 1962, Coombs i Whittingham 1966, Ellyard i Gibbs 1969, Ellyard i San Pietro 1969). Podobnie próbowano wyjaśnić mechanizm działania tlenu na proces wzmożonego ciemniowego wiązania CO_2 . Według Miyachi i współ. (1957) i Tamiya i współ. (1957) tlen wpływa na (En) poprzez zmniejszanie ilości czynnika zredukowanego „R” wytwarzanego na świetle, niezbędnego do procesu wiązania CO_2 w ciemności. Hogetsu i Miyachi (1970) w doświadczeniach z *Chlorella* wykazali, że (En) zależy od warunków tlenowych panujących w ciemności a nie podczas fotosyntezy na świetle. Stamieszkin i współ. (1972) stwierdzili, że tlen nie zmienia drogi węgla podczas wzmożonego ciemniowego wiązania CO_2 , gdyż aż 76% radioaktywności znaleziono w kwasie jabłkowym i asparaginowym,

niezależnie od stężenia tlenu. Tlen mógłby zatem wpływać na (En), u roślin C_4 , hamując przeniesienie węgla C—4 na najbliższy akceptor węgla (Lewanty i współ. 1971). Inhibicja ta powodowałaby więc akumulację szczawiooctanu i jabłczanu, co z kolei hamowałoby reakcję karboksylacji PEP, a więc reakcję zachodzącą podczas wiązania CO_2 , w krótkim okresie ciemności, po wyłączeniu światła.

Zjawisko wzmożonego ciemniowego wiązania CO_2 może być stosowane do badań szeregu zjawisk fotosyntezy *in vivo* u roślin C_3 i co jest szczególnie aktualne do badań fotosyntezy u roślin C_4 . (En) może między innymi służyć do badań intermedatów cyklów Calvina, Hatcha i Slacka, akceptorów CO_2 tj. RuDP i PEP, enzymów fotosyntetycznych, do wyjaśnienia mechanizmu działania tlenu na pierwsze etapy fotosyntezy. Jednym z przykładów wykorzystania (En) do badań drogi węgla w fotosyntezie u roślin typu C_4 jest praca Laber i współ. (1971). W doświadczeniach z kukurydzą, autorzy ci, badali rozdział radioaktywności w poszczególnych węglach w cząsteczkach kwasu jabłkowego powstającego podczas wzmożonego ciemniowego wiązania CO_2 . Stwierdzono, że 2/3 radioaktywności ulokowane było w węglu C—4 a 1/3 w węglu C—1. Wynik ten nie był zgodny ze schematem zaproponowanym przez Hatcha i Slacka (1970). Badacze sugerują, że obok PEP dodatkowym akceptorem CO_2 u kukurydzy jest RuDP. Wobec tego jabłczan mógłby powstawać nie tylko ze szczawiooctanu, ale również z 3—PGA i stąd znakowanie węgla C—1, jak proponują Bradbeer i współ. (1958) w doświadczeniach z roślinami z rodziny *Crassulaceae*. Przykłady innych zastosowań (En) do badań fotosyntezy można znaleźć w pracy Togasaki i Botosa (1971). Wymienieni autorzy, w doświadczeniach z *Anacystis nidulans*, badali procentową zawartość radioaktywności w poszczególnych węglach w cząsteczkach kwasu 3-fosfoglicerynowego, powstającego w ciągu 8 minut na świetle lub w ciemności. Stwierdzono, że kiedy komórki glonów umieszczone były na świetle o niskim natężeniu lub w ciemności, po wyłączeniu światła, prawie cała radioaktywność zlokalizowana była w węglu C—1. Natomiast w silnym świetle znakowany był także węgiel w pozycji α i β . Dane te dowodzą, że dla sprawnego funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego potrzebne jest odpowiednio silne światło. Autorzy ci sugerują, że w ciemności i przy bardzo niskich natężeniach światła przeważa, u roślin, proces wiązania wydzielonego endogennie CO_2 nad wiązaniem $^{14}CO_2$ podawanego z zewnątrz i stąd nieznaczne znakowanie węgla w pozycjach α i β w cząsteczkach 3—PGA. Drugi przykład wykorzystania (En) znaleziony w pracy Togasaki i Botosa (1971) dotyczy badań ciemniowej karboksylacji RuDP. Wymienieni badacze stwierdzili, że w ciemności, po wyłączeniu światła, zdolność komórek glonów do wiązania CO_2 szybko spada. Podobny spadek zaobserwowano na świetle w obecności DCMU. Spadek ten był silniejszy w powietrzu niż w atmosferze azotu. Stąd autorzy ci wnioskują, że skoro zachodząca w ciemności karboksylacja zależna jest od wielkości puli zakumulowanego RuDP, to spadek zdolności wiązania CO_2 łączy się z inaktywacją fosforybulokinazy. Inaktywacja ta według autorów może zachodzić poprzez zmiany stanu utlenienia i redukcji chloroplastów, przyspieszane w warunkach tlenowych.

Podsumowując, wydaje się, że zjawisko wzmożonego ciemniowego wiązania

CO₂ należy rozpatrywać jako proces przejściowy pomiędzy stadium świetlnym fotosyntezy i wiązaniem CO₂ z jednej strony a oddychaniem ciemniowym z drugiej strony. Za udowodniony należy uważać fakt, że wzmożone ciemniowe wiązanie CO₂ w zasadzie ograniczone jest do reakcji karboksylacji akceptora CO₂, tj. RuDP u roślin C₃ i PEP u roślin typu C₄. Wydaje się być pewne również, że w pierwszych minutach ciemności, po wyłączeniu światła, czynne są jeszcze enzymy biorące udział w wiązaniu CO₂, które z czasem ulegają inaktywacji. Ta inaktywacja wydaje się być przyczyną ograniczonego wiązania CO₂ w ciemności. Szereg zagadnień związanych z tym procesem nie jest w pełni wyjaśnionych a w szczególności zależność (En) od reakcji świetlnych fotosyntezy, mechanizm działania tlenu na (En), działanie jakości światła. Wydaje się, że prace nad wzmożonym ciemniowym wiązaniem CO₂ zachodzącym w krótkim okresie ciemności, po wyłączeniu światła, mogą wnieść szereg cennych informacji dla wyjaśnienia wielu aspektów fotosyntezy.

Autorka pracy dziękuje doc. dr. J. Poskucie za pomoc oraz cenne uwagi dotyczące zagadnień związanych z tematem tego artykułu.

Zespół Badania Metabolizmu Roślin, Instytut Botaniki UW

LITERATURA

- Baldry C. W., Bucke C., Coombs J., 1969. *Light/phosphoenolpyruvate dependent carbon dioxide fixation by isolated sugar cane chloroplast*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 37. 828—832.
- Bassham J. A., Kirk M., 1962. *The effect of O₂ on the reduction of CO₂ to glycolic acid and other products during photosynthesis by Chlorella*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 9. 376—380.
- Bassham J. A., Kirk M., 1963. *Synthesis of compounds from ¹⁴CO₂ by Chlorella in the dark following preillumination*. In: *Studies on Microalgae and photosynthetic Bacteria*. Plant Cell. Physiol. (Special Issue). 493—504.
- Benson A. A., Calvin M., 1947. *The dark reaction in photosynthesis*. Science. 105. 648—649.
- Benson A. A., Calvin M., 1949. *Photosynthesis in Plants*. Iowa State College, Press, Ames Iowa. 381.
- Benson A. A., Calvin M., 1950. *Respiration and photosynthesis*. J. Exp. Bot. 1. 65—68.
- Björkman O., 1966. *The effect of oxygen concentration on photosynthesis in higher plants*. Physiol. Plant. 19. 618—633.
- Bradbeer J. W., Ranson S. L., Stiller M., 1958. *Malate synthesis in Crassulaceae leaves. I. The distribution of ¹⁴C in malate of leaves exposed to ¹⁴CO₂ in the dark*. Plant Physiol. 33. 66—70.
- Coombs J., Whittingham C. P., 1966. *The effect of high partial pressures of oxygen on photosynthesis in Chlorella*. Phytochem. 5. 643—651.
- Ellyard P. W., Gibbs M., 1969. *The Warburg effect as investigated in isolated chloroplast*. Plant Physiol. 44. 1115—1121.
- Ellyard P. W., San Pietro A., 1969. *The Warburg effect in a chloroplast-free preparation from Euglena gracilis*. Plant Physiol. 44. 1677—1683.
- Fager E. W., Rosenberg J. L., Gaffron H., 1950. *Intermediates in photosynthesis*. Fed. Proc. 9. 535—542.

- Farineau J., 1971. *Studies of light and dark fixation of CO₂ in C-4 plants*. From: IInd International Congress on photosynthesis. Stresa. 1971—1979.
- Gaffron H., Fager E. W., 1951. *The kinetics and chemistry of photosynthesis*. Ann. Rev. Plant Physiol. 2. 87—114.
- Hatch M. D., Slack C. R., 1970. *Photosynthetic CO₂-fixation pathways*. Ann. Rev. Plant Physiol. 21. 141—162.
- Hirokawa T., Miyachi S., Tamiya H., 1958. *Effect of H₂O₂ on the light induced capacity of CO₂-fixation in green algae*. J. Biochem. 45. 1005—1010.
- Hogetsu D., Miyachi S., 1970. *Effect of oxygen on the light-enhanced dark carbon dioxide fixation in Chlorella*. Plant Physiol. 45. 178—182.
- Kato T., Hirokawa T., Miyachi S., 1958. *Effect of preillumination upon the Hill reaction in Chlorella cells*. J. Biochem. 45. 907—912.
- Kortschak H. P., Hartt C. E., Burr G. O., 1965. *Carbon dioxide fixation in sugar cane leaves*. Plant Physiol. 40. 209—213.
- Laber L. I., Latzko E., Levi C., Gibbs M., 1971. *Light enhanced dark fixation of CO₂ by corn and spinach leaves*. From: IInd International Congress on photosynthesis. Stresa. 1737—1744.
- Lewanty Z., Maleszewski S., Poskuta J., 1971. *The effect of oxygen concentration on ¹⁴C incorporation into products of photosynthesis of detached leaves of maize*. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 65. 469—472.
- Miyachi S., Izawa S., Tamiya H., 1955. *Effect of oxygen on the capacity of carbon dioxide fixation by green algae*. J. Biochem. 42. 221—224.
- Miyachi S., Hirokawa T., Tamiya H., 1957. *The „background” CO₂-fixation occurring in green cells and its possible relation to the mechanism of photosynthesis*. In: Research in Photosynthesis. (Gaffron H. et al. eds.) Interscience Publs. New. York. 205—212.
- Miyachi S., 1960. *Effect of some sulfhydryl reagents on light-induced CO₂-fixation*. Plant Cell Physiol. 1. 117—130.
- Nagy A. H., Bokany A., Doman N. G., Faludi-Daniel A., 1971. *Activities of carboxylating enzymes in light treated leaves from normal and carotenoid mutant maize*. From IInd International Congress on Photosynthesis. Stresa. 1861—1868.
- Pedersen T. A., Kirk M., Bassham J. A., 1966 a. *Inhibition of photophosphorylation and photosynthetic carbon cycle*. Biochim. Biophys. Acta. 112. 189—203.
- Pedersen T. A., Kirk M., Bassham J. A., 1966 b. *Light-dark transients in levels of intermediate compounds during photosynthesis in airadapted Chlorella*. Physiol. Plantarum. 19. 219—231.
- Poskuta J., 1969. *Photosynthesis, respiration and post-illumination fixation of CO₂ by corn leaves as influenced light and oxygen concentration*. Physiol. Plantarum. 22. 43—54.
- Poskuta J., 1971. *Studies of the CO₂ exchanges rates in light and darkness by detached leaves of tobacco as influenced by oxygen concentration*. From IInd International Congress on Photosynthesis. Stresa. 2121—2127.
- Samejima M., Miyachi S., 1970. *Light-enhanced dark carbon dioxide fixation in maize leaves*. Photosynthesis and Photorespiration. (Hatch M. D. et al. eds). 211—217.
- Stamieszkin I., Maleszewski S., Poskuta J., 1972. *The effect of oxygen concentration during preillumination on enhanced dark CO₂-fixation by maize leaves*. Z. Pflanzenphysiol. 67. 180—182.
- Tamiya H., Miyachi S., Hirokawa T., 1957. *Some new preillumination experiments with carbon -¹⁴*. In: Research in Photosynthesis. (Gaffron et al. eds). Interscience Publs. New. York. 212—222.
- Togasaki R. K., Botos C. R., 1971. *Enhanced dark CO₂ fixation by preilluminated algae; as tool for analysis of photosynthetic mechanisms in vivo*. From: IInd International Congress on Photosynthesis. Stresa. 1759—1772.
- Togasaki R. K., Gibbs M., 1963. *Preillumination experiments in Chlorella pyrenoidosa and Anacystis nidulans*. In: Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria. (Special Issue). Plant Cell. Physiol. 505—511.
- Togasaki R. K., Gibbs M., 1967. *Enhanced dark CO₂ fixation by preilluminated Chlorella pyrenoidosa and Anacystis nidulans*. Plant Physiol. 42. 991—996.

- Urbach W., Hudson M. A., Ullrich W., Santarius K. A., Heber U., 1965. *Verteillung und Wanderung von phosphoglycerat zwischen den chloroplasten und dem cytoplasma während der photosyntheses.* Z. Naturforsch. 20 b. 890—898.
- Wildner G. B., Zilg H., Griddle R. S., 1971. *Light effect on isolated ribulose diphosphate carboxylase activity.* From: IInd International Congress on Photosynthesis. Stresa. 1825—1830.
- Wilson A. T., Calvin M., 1955. *The photosynthetic cycle, CO₂ dependent transients.* J. Am. Chem. Soc. 77. 5948—5957.
- Woskresieńska N. P., Pojarkowa N. M., Drozdowa I. S., 1971. *Wlijanie siniewo swieta na aktywnost karboksylazy ribulezodifosfata w listiach Vicia faba.* Fizjol. Rast. 18. 683—689.
- Ziegler I., 1971. *On the mechanism of activation of ribulose-5-phosphate kinase in isolated chloroplasts.* Reprint from IInd International Congress on Photosynthesis. Stresa. 1847—1853.