

FOTOHEMIJSKE AKTIVNOSTI HLOROPLASTA CRNOG BORA*

With Summary in English

MARIJANA PLESNIČAR i MILA BOGDANOVIĆ

(Institut za primenu nuklearne energije u poljoprivredi,
veterinarstvu i šumarstvu, Zemun)

Primljeno 22. 10. 1975.

Uvod

Naša ranija istraživanja pokazala su da plastidi kotiledona crnog bora sadržavaju oba hlorofilna pigmenta i razvijen sistem grana posle šest dana klijanja u mraku (Nikolić i Bogdanović 1972). Pokazano je da je odnos hlorofila $a : b$ bio između 2,5 do 3,2 (Bogdanović, 1973) što odgovara odnosu u zrelim hloroplastima. Ovi rezultati su ukazivali na mogućnost razvoja fotosintetskih aktivnosti u plastidima kotiledona crnog bora bez delovanja svetlosti.

Pre četiri godine uspeli smo da izolujemo fotoaktivne hloroplaste iz kotiledona crnog bora koji je gajen u mraku (nepublikovani podaci). Dobijena aktivnost fotosistema I (oko 630 nmola oksidovanog Cyt c /mg hl., h) određena je praćenjem fotooksidacije Cyt c u prisustvu metilvioligena kao akceptora elektrona, a aktivnost fotosistema II (500 μ mola redukovanog K_3Fe/CN_6 /mg hl., h) određena je praćenjem fotoredukcije kalijum fericijanida, kao što je opisao Trebst (1972). Međutim, Oku i sar. (1974) nisu zabeležili aktivnost fotosistema II u plastidima izolovanim iz kotiledona belog bora (*Pinus sylvestris* L.) posle klijanja u mraku. Zbog toga smo preispitali i dopunili naše ranije rezultate merenjem aktivnosti fotosistema II izolovanih hloroplasta crnog bora. Dobijeni su podaci za brzinu oslobađanja kiseonika i za sintezu ATP putem neciklične fotofosforilacije.

Materijal i metodi

Za izolovanje plastida korišćeni su kotiledoni crnog bora *Pinus nigra* Arnold razne starosti, posle gajenja u mraku i na svetlosti. Plastidi su izolovani po postupku koji je opisan ranije (Plesničar i Bendall,

* Rad saopšten na II. simpozijumu Jugoslovenskog društva za biljnu fiziologiju, Stubičke Toplice, 20—23. 5. 1975. godine.

1973). Oko 7 g kotiledona ohlađeno je na 3—5 °C i homogenizirano u porcelanskom avanu u medijumu za izolovanje sledećeg sastava: 0,4 M saharoza, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0,05 M Na₄P₂O₇, 0,6% polietilenglikol(PGA) 4000, 0,05% cistein i 0,25% GSA (govedi serum albumin), pH 8,0. Filtriranje je vršeno preko 8 slojeva gaze. Filtrat je centrifugovan 1 minut na 300 x g, a zatim 5 minuta na 1500 x g. Talog je ponovo resuspendovan u medijum za ispiranje (0,4 M saharoza, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 50 mM tricin, 1,25% GSA, pH 8,0) i centrifugovan na 1500 x g u toku 5 minuta.

Reakciona sredina za praćenje oslobađanja kiseonika i merenje sinteze ATP (West i Wiskich 1968) bila je 50 mM tricin 5 mM Pi i 1 mM MgCl₂, pH 7,5.

Oslobađanje kiseonika u suspenziji hloroplasta mereno je pomoću Klarkove elektrode (Delieu i Walker 1972). Praćeno je oslobađanje kiseonika u prisustvu kalijumfericijanida — osnovna aktivnost, aktivnost sa dodatkom ADP i NH₄Cl.

Rezultati i diskusija

Brzina oslobađanja kiseonika u hloroplastima formiranim na svetlosti (kriva 1) i u mraku (kriva 2) pokazana je na sl. 1. Ovde se vidi da hloroplasti formirani u mraku oslobađaju kiseonik u prisustvu kalijumfericijanida, čim se izlože svetlosti. Takođe se zapaža da je brzina oslobađanja O₂ u hloroplastima formiranim na svetlosti znatno veća nego kod hloroplasta formiranih u mraku.

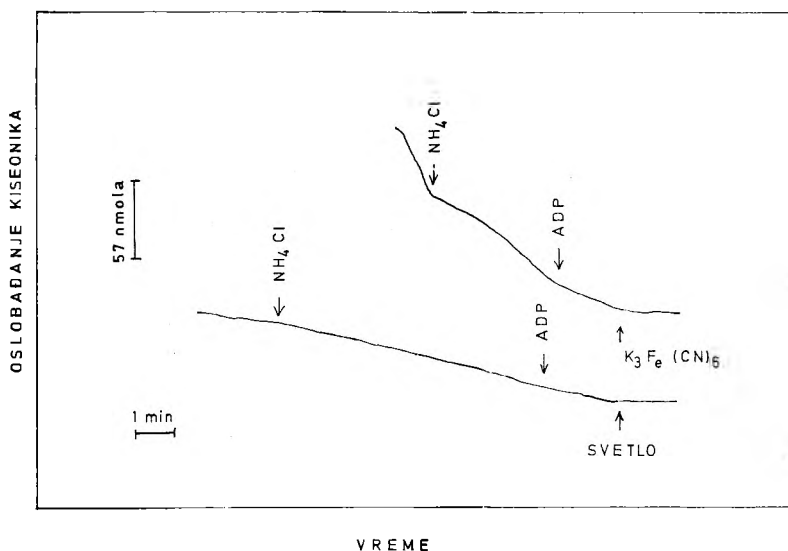
Aktivnost fotosistema II varira sa starošću kotiledona (tab. 1 i 2). Maksimalna brzina oslobađanja kiseonika iznosi 369 nmola O₂/mg hl, min, posle 16 dana klijanja u mraku i 693 nmola O₂/mg hl, min, posle 16 dana klijanja na svetlosti. ADP stimuliše oslobađanje kiseonika kako u hloroplastima formiranim na svetlosti tako i u onim formiranim u mraku. Međutim, pri primenjenim eksperimentalnim uslovima NH₄Cl stimuliše oslobađanje kiseonika samo u hloroplastima formiranim na svetlosti. Merenje sinteze ATP pokazalo je da hloroplasti formirani u mraku sintetišu oko 100 μmola ATP/h, mg hl.

Hloroplasti crnog bora formirani na svetlosti pokazuju gotovo dvostruko veću aktivnost fotosistema II u odnosu na hloroplaste formirane u mraku. Dobijene vrednosti za aktivnost fotosistema II nešto su niže od onih koje su dobijene na biljnim vrstama kod kojih su uslovi za izolovanje i merenje fotohemijskih aktivnosti dobro definisani.

Naši rezultati su pokazali da hloroplasti crnog bora formirani u mraku pored aktivnosti fotosistema I ispoljavaju aktivnost fotosistema II i mogu da vrše necikličku fotofosforilaciju čim se izlože svetlosti.

*

Kad je ovaj rad bio pripremljen za štampu, dobili smo rad O k u a i saradnika (O k u et al. 1975): Oxygen evolution in dark- developed spruce chloroplasts. Plant and Cell Physiol. 16: 101—108) u kojem je prikazano da hloroplasti smrče formirani u mraku oslobađaju kiseonik kad se izlože svetlosti.



Gornja kriva:

Hloroplasti izolovani iz kotiledona crnog bora gajenog na svetlosti. U 3 ml reakcione smeše dodato je: 51 μg hlorofila hloroplasta, 2,5 μmola kalijumfericijanida, 0,3 μmola ADP, 20 μmola NH_4Cl .

Upper curve:

Chloroplasts isolated from cotyledons of black pine grown in the light. 51 μg of chloroplast chlorophyll, 2,5 μmols of potassium ferricyanide, 0,3 μmols of ADP, 20 μmols of NH_4Cl was added to 3 ml of the reaction mixture.

Donja kriva:

Hloroplasti izolovani iz kotiledona crnog bora gajenog u mraku. U 3 ml reakcione smeše dodato je: 25 μg hlorofila, 2,5 μmola kalijumfericijanida, 0,3 μmola ADP, 20 μmola NH_4Cl . Ostali uslovi dati su u tekstu.

Lower curve:

Chloroplasts isolated from cotyledons of black pine grown in the dark. 25 μg of chlorophyll, 2,5 μmols of potassium ferricyanide, 0,3 μmols of ADP, 20 μmols of NH_4Cl was added to 3 ml of reaction mixture. Other conditions are given in the text.

Sl. 1. Vremenski tok oslobađanja kiseonika u hloroplastima crnog bora
Fig. 1. Time course of oxygen evolution in black pine chloroplasts.

Tabela 1. Razvoj aktivnosti fotosistema 2 u plastidima crnog bora formiranim u mraku

Table 1. Development of activity of photosystem 2 in black pine plastids formed in the dark

Starost kotiledona (dana) Age of cotyledons (in days)	Brzina oslobađanja kiseonika (nmola O ₂ /mg hl, min) Oxygen evolution rate (nmols of O ₂ /mg Chl, min)		
	osnovna basic	+ ADP	+ NH ₄ Cl
9	—	—	—
12	75	150	—
13	255	366	—
16	369	436	—
21	143	—	—

Tabela 2. Razvoj aktivnosti fotosistema 2 u hloroplastima crnog bora

Table 2. Development of activity of photosystem 2 in black pine chloroplasts

Starost kotiledona (dana) Age of cotyledons (in days)	Brzina oslobađanja kiseonika (nmola O ₂ /mg hl, min) Oxygen evolution rate (nmols of O ₂ /mg Chl, min)		
	osnovna basic	+ ADP	+ NH ₄ Cl
9	204	502	1874
15	621	992	2117
16	696	1596	1885

Literatura

- Bogdanović, M.*, 1973: Chlorophyll formation in the dark. I. Chlorophyll in pine seedlings. *Physiol. Plant.* 29, 17—18.
- Delieu, T.* and *D. A. Walker*, 1972: An improved cathode for measurement of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts. *New Phytol.* 71, 201—225.
- Nikolić, D.* and *M. Bogdanović*, 1972: Plastide differentiation and chlorophyll synthesis in cotyledons of black pine seedlings grown in the dark. *Protoplasma.* 75, 205—233.
- Oku, T., K. Sughara* and *G. Tomita*, 1974: Functional development of photosystems I and II in dark-grown pine seedlings. *Plant and Cell Physiol.* 15, 175—178.
- Plesničar, M.* and *D. S. Bendall*, 1973: The photochemical activities and electron carriers of developing barley leaves. *Biochem. J.* 136, 803—812.
- Trebst, A.* 1972: Measurement of Hill reaction and photoreductions. In: *Methods in Enzymology.* Vol. 23 B, Ed. by A. San Pietro, pp 146—165.
- West, K. R.* and *J. T. Wiskich*, 1968: Photosynthetic control by isolated pea chloroplasts. *Biochem. J.* 109, 527—532.

SUMMARY

PHOTOCHEMICAL ACTIVITIES OF THE BLACK PINE CHLOROPLASTS

Marijana Plesničar and *Mila Bogdanović*

(Institute for Application of Nuclear Energy in Agriculture, Veterinary Medicine and Forestry, Zemun)

The activity of the Photosystem II in isolated chloroplasts from black pine cotyledons grown in the dark and in the light was followed. Both chloroplasts — formed in the light and in the dark were able to evolve oxygen in the presence of potassium ferricyanide immediately after being exposed to light. ADP stimulates oxygen evolution in both chloroplasts preparations. NH_4Cl stimulates oxygen evolution only in chloroplasts formed in the light. Chloroplasts formed in the dark can synthesize ATP by non-cyclic photophosphorylation.

Dr Marijana Plesničar i
dr Mila Bogdanović
Institut za primenu nuklearne energije
u poljoprivredi, veterinarstvu i šumarstvu
11680 Zemun (Jugoslavija)