

УДК 577.152.311: 577.117.3

ВАРІАЦІЯ СПІВВІДНОШЕННЯ ВМІСТУ ХЛОРОФІЛІВ *a* І *b* ПРИ АДАПТАЦІЇ РОСЛИН ДО ЗОВНІШНІХ ЧИННИКІВ

© 2018 р. О. О. Сиваш, Н. Ф. Михайленко, О. К. Золотарьова

*Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного
Національної академії наук України
(Київ, Україна)*

Адаптація рослин і мікроводоростей до інтенсивності і спектрального складу падаючого світла відбувається завдяки змінам у морфології, фізіології, біохімії та структурі листків і хлоропластів. Огляд присвячений розгляду чинників, що впливають на вміст і співвідношення хлорофілів (Хл) *a/b* у фотосинтетичних клітинах. Залежно від рівня освітленості варіює ультраструктура хлоропластів C_3 -рослин: при зниженні інтенсивності світла збільшується кількість гранальних тилакоїдів і ступінь їх стекингу. Рослини, вирощені при насичуючій інтенсивності світла, адаптовані до швидкого використання квантів сонячного світла і характеризуються високими значеннями співвідношення Хл *a/b*, швидкості електронного транспорту та зниженням вмісту світлозбиральних комплексів (СЗК) і Хл у фотосистемі II (ФС II). C_3 -рослини, вирощені за низької інтенсивності світла, навпаки, компенсують обмежену кількість доступної для росту світлової енергії інтенсивним збільшенням вмісту пігментів та СЗК і зменшенням співвідношення Хл *a/b*. У C_4 -рослин, генетично адаптованих до високих інтенсивностей світла, пігментний апарат і ультраструктура хлоропластів клітин мезофілу і обкладки провідних пучків істотно відрізняються. Для перших характерна наявність великої кількості гранальних тилакоїдів при відносно невисокому співвідношенні Хл *a/b* (~ 3), тоді як тилакоїдна система хлоропластів у провідних пучках є переважно ламелярною з низьким вмістом Хл *b* (співвідношення *a/b* ~ 5–10). Відносний вміст Хл *b* у тилакоїдах визначається накопиченням пігментованих антенних білків. Родина білків СЗК включає в себе ядерно-кодовані інтегральні білки тилакоїдної мембрани, які при асоціації з основними комплексами обох фотосистем утворюють гнучку периферійну антену для збільшення поперечного перерізу поглинання світла. СЗК регулює ефективність утилізації світла і забезпечує захист від фотоокиснювального стресу. В останні роки було досягнуто значного прогресу у з'ясуванні структури, функцій і регуляторних шляхів за участю СЗК, проте багато молекулярних деталей потребує уточнення. У роботі проаналізовано сучасні знання про біогенез СЗК, починаючи від регуляції циклу взаємоперетворення Хл *a* → Хл *b*, організації пігмент-білкових комплексів до регулювання збірки і функціонування СЗК за різних умов. Гени, які контролюють ці події, є потенційними кандидатами для біотехнологічних застосувань, спрямованих на оптимізацію ефективності використання фотосинтетичних організмів.

Ключові слова: *хлорофіл a*, *хлорофіл b*, *пігмент-білкові комплекси*, *фотосистеми*, *метаболізм хлорофілів*, *мутанти*, *спектрофотометричний аналіз*

Адаптація до умов освітлення супроводжується зміною цілого ряду як морфологічних і структурних параметрів листків, так і фізіолого-біохімічних характеристик фотосинтезуючих клітин (табл. 1). При низькій освітленості зростають розміри листків, збільшується кількість гранальних тилакоїдів і ступінь їх стекин-

гу, зростає відносний вміст хлорофілу (Хл) на одиницю маси і вміст світлозбиральних комплексів фотосистеми II (СЗК ФС II), тобто загальна стратегія адаптації до нестачі світла спрямована на покращення світлозбору за рахунок підвищення вмісту Хл і СЗК (Walladares, Niinemets, 2008). Висока інтенсивність світла спричиняє дві різноспрямовані відповіді – кількісне зростання компонентів апарату фотосинтезу (електрон-транспортних комплексів, зокрема цитохрому *f*, АТФ-синтази, ензимів циклу Кальвіна) для утилізації додаткової енергії, і

Адреса для кореспонденції: Золотарьова Олена Костянтинівна, Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, вул. Терещенківська, 2, м. Київ, МСП-1, 01601, Україна;
e-mail: membrana@ukr.net

ВАРІАЦІЯ СПІВВІДНОШЕННЯ ВМІСТУ ХЛОРОФІЛІВ *a* і *b*

Таблиця 1. Характеристики рослин при адаптації до низької і високої інтенсивності світла

Характеристика	Інтенсивність світла	
	Низька	Висока
Морфологія і анатомія листка		
Товщина листової пластинки	низька	висока
Щільність продохів	низька	висока
Розмір листка	великий	малий
Кількість хлоропластів у клітині	мала	велика
Кількість тилакоїдів у гранах	велика	мала
Фізіологічні та біохімічні параметри		
Вміст Хл на одиницю площі листка	низький	високий
Вміст Хл на на одиницю сухої речовини	високий	низький
Співвідношення Хл <i>a/b</i>	низьке	високе
Співвідношення ФС II / Хл	низьке	високе
Співвідношення ФС I / Хл	не змінюється	
Співвідношення СЗК II / Хл	високе	низьке
Вміст рубіско	низький	високий
Співвідношення АТР-синтаза / Хл	низьке	високе
Співвідношення цитохром <i>b_f</i> / Хл	низьке	високе
Ефективність карбоксилювання	низька	висока
Квантовий вихід	високий	низький
Швидкість електронного транспорту	низька	висока
Чутливість до фотоінгібування	висока	низька
Вміст пігментів ксантофілового циклу	низький	високий

зменшення кількості світлозбиральних комплексів для уникнення ефектів надлишкового збудження і пошкодження фотосистем (Bailey et al., 2001; Yamori et al., 2010). Здатність витримувати різну інтенсивність світла сильно варіює залежно від виду рослин (Фомішина та ін., 2009; Сиваш та ін., 2016). Види, що ростуть переважно в умовах затінення, виявляють нижчу здатність до адаптації при зростанні інтенсивності світла, на відміну від рослин із незатінених місць (Murchie, Horton, 1997). Характерною ознакою рослин, що зростають при нестачі світла, є підвищений вміст хлорофілу (Хл) *b* і, відповідно, знижене співвідношення Хл *a/b*. У м'яких умовах освітлення рослини, адаптовані до варіювання інтенсивності світла, мають тенденцію до більш різкої зміни співвідношення Хл *a/b*, ніж ті, що постійно вегетують виключно в світлових чи тінювих умовах (Murchie, Horton, 1997). Це дозволяє розглядати співвідношення Хл *a/b* як показник, що характеризує залежність стану фотосинтетичного апарату рослини від умов її зростання. У цьому зв'язку необхідно оцінити межі, в яких може змінюватися значення цього параметра за різних фізіологічних умов. У першу чергу ці межі визначаються складом і співвідношенням хлорофілів-вмісних білків, які розташовані у фотосинтетичних мембранах нерівномірно і, таким чином, визначають особливості ультраструктури мем-

бран хлоропластів, сформованих за різних умов освітлення рослин.

Структурна організація світлозбору у вищих рослин

Хлоропласт – органела, оточена двома бішаровими мембранами, зовнішньою і внутрішньою, які разом називають оболонкою хлоропласту (рис. 1). Всередині хлоропласту міститься складна сітка внутрішніх (тилакоїдних) мембран у стромі – водному середовищі між внутрішньою мембраною оболонки і тилакоїдними мембранами. Плоскі стиснуті везикули тилакоїдів відділяють від стромальної фази закритий компартмент, так званий внутрішньотилакоїдний простір, або люмен. Тилакоїдні мембрани формують фізично неперервну тривимірну сітку, яка складається з двох морфологічно відмінних областей: гран – щільно упакованих (стикованих) стопок тилакоїдів, типово з 10-20 шарів, які утворюють циліндричні стоси діаметром 300-600 нм, і ламел стромі – не стикованих тилакоїдів, що зв'язують грані. Щільно упаковані тилакоїди гран складають близько 80% внутрішньої мембрани хлоропласту (Albertsson, Andreasson, 2004).

Сучасні ціанобактерії, а також багато еукаріотичних зелених водоростей не містять гран. Вважається, що первинно грані розвинулись для оптимізації фотосинтетичної ефективності в умовах затінення, коли рослини колоні-

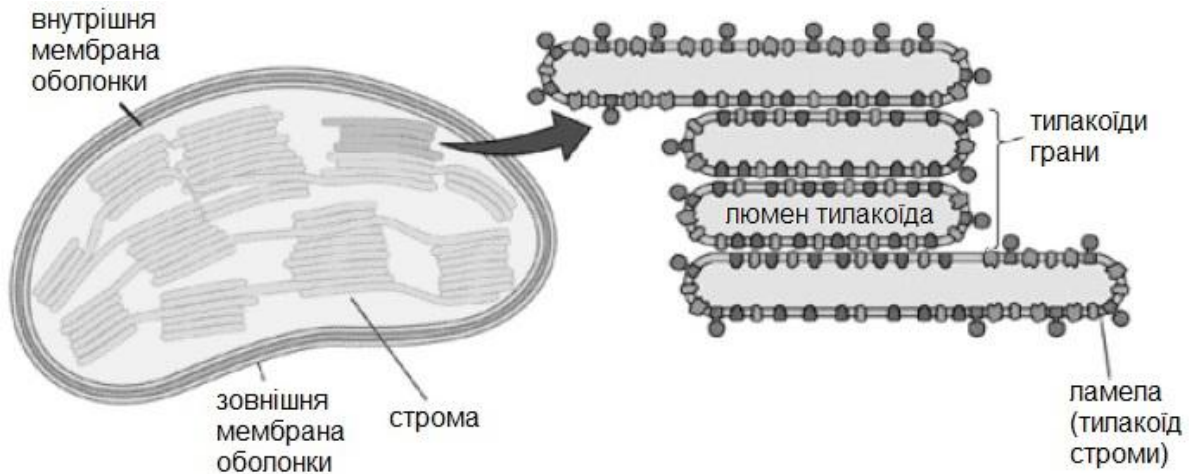


Рис. 1. Схема будови хлоропласта.

зували суходіл (Mullineaux, 2005). Гранальна упаковка дозволила дуже істотно збільшити відношення поверхні тилакоїдних мембран до об'єму хлоропласта (Barber, 1980) за рахунок концентрування великої кількості світлозбиральних комплексів для захоплення обмеженої кількості квантів світла. Дуже чутливі до умов оточення як кількість гран і тилакоїдів у гранах, так і молекулярний склад мембран, який може значно змінюватись для оптимізації світлозбору і захисту фотосинтетичного апарату від фотопошкодження (Johnson et al., 2011). Найважливішими факторами, що запускають ці зміни, є інтенсивність світла і енергія квантів, присутність катіонів, температура, забезпеченість водою та інші. Зокрема, при низькій інтенсивності світла у рослин виявляють більше гран і більше тилакоїдів у гранах, а у рослин, адаптованих до високої інтенсивності світла, спостерігається протилежна картина (Anderson, 1986; Ruban, 2009). Класичний приклад – *Alocasia microrrhiza*, що росте при дуже сильному затінненні у вологих тропічних лісах, має більш ніж 100 тилакоїдів в грані (Goodchild et al., 1972).

C₄ рослини

У *C₄*-рослин остаточна фіксація CO₂ забезпечується завдяки кооперативному фотосинтезу, який узгоджено відбувається у клітинах мезофілу і обкладки провідних пучків. Світлова стадія фотосинтезу забезпечується переважно клітинами мезофілу, а рубіско функціонує в клітинах обкладки. Хлоропласти мезофілу подібні за структурою до хлоропластів *C₃*-вищих рослин, у той час як у хлоропластах обкладки провідних пучків великі видовжені тилакоїди не утворюють гран. Отже, *C₄*-рослинам притаманний хлоропластний диморфізм (Ghirardi, Melis, 1983) (рис. 2).

Існують значні відмінності в організації компонентів електронного транспорту в хлоропластах клітин мезофілу і обкладки провідних пучків. Так, у *Zea mays* хлоропласти мезофілу характеризуються співвідношенням Хл *a/b* близьким до 3, вони містять грані та мають повний набір компонентів фотосинтетичного транспорту електронів, порівнюваний з хлоропластами *C₃*-рослин. Агранальні хлоропласти клітин обкладки (Хл *a/b* > 5,0) містять ФС I та цитохром *b_{6f}*, проте майже позбавлені ФС II та зв'язаного з нею Хл *a/b* – СЗК та цитохрому *b₅₅₉* (Jenkins, Voag, 1985). В хлоропластах обкладки окремих *C₄*-рослин можуть зустрічатися компоненти ФС II, проте доведено, що в них немає Хл *a/b*-вмісного СЗК, який у гранах асоційований з ФС II (Anderson, Levine, 1974; Genge et al., 1974; Anderson, 1980). У хлоропластах клітин обкладки грані виявляють лише на ранніх стадіях розвитку листка (Ghirardi, Melis, 1983); у процесі дозрівання вони селективно втрачають ФС II і зв'язаний з нею СЗК. Фотосинтетична одиниця ФС I залишається незмінною і функціонально незалежною від СЗК у хлоропласті, оскільки відсутність цього комплексу в хлоропластах клітин обкладки не призводить до змін її розміру.

Таким чином, співвідношення Хл *a/b* у *C₄*-рослин зазвичай вище ніж у *C₃*-рослин через дуже низький вміст Хл *b* у клітинах обкладки. Так, хлоропласти обкладки провідних пучків листків *Zea mays* характеризуються високими співвідношеннями Хл *a/b* (близько 10); у цілому ж у листках Хл *a/b* становить близько 5 (Jenkins, Voag, 1985). Для інших *C₄*-рослин були визначені співвідношення Хл *a/b* близько 6 у хлоропластах клітин обкладки та близько 4 – у клітинних екстрактах листків. Разом з цим у *C₃*-

ВАРІАЦІЯ СПІВВІДНОШЕННЯ ВМІСТУ ХЛОРОФІЛІВ a/b

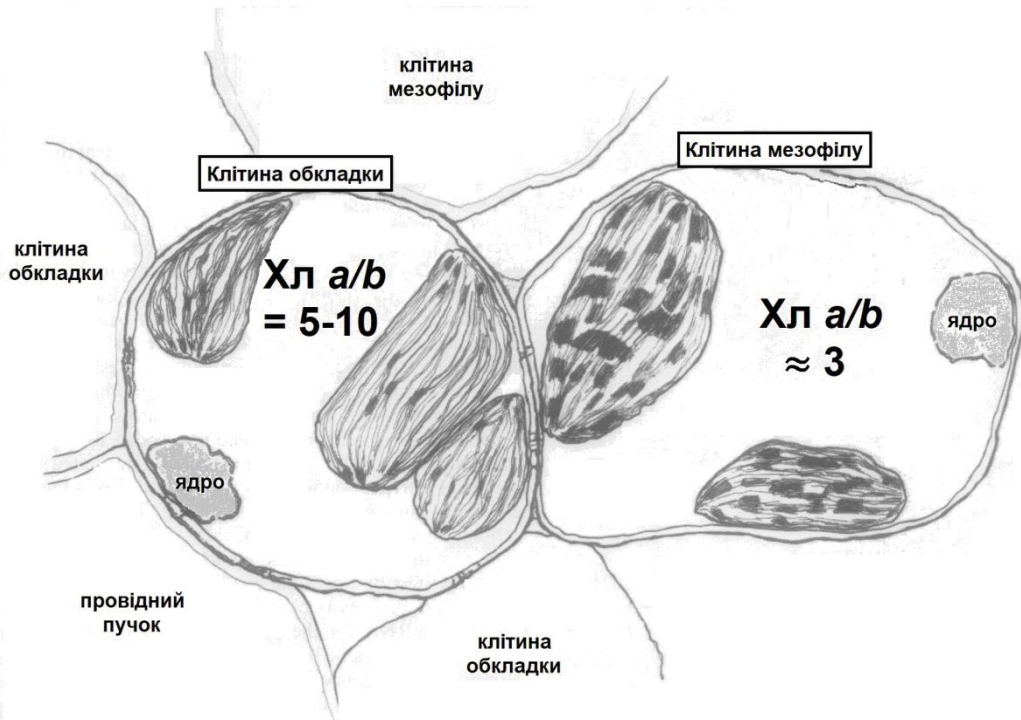


Рис. 2. Структура типових клітин листка C_4 -рослини і співвідношення Хл a/b у них.

рослин цей показник становить 2,5-5,0 (Lichtenthaler, 1987; Dymova, Fiedor, 2014).

Організація фотосинтетичних комплексів у тилакоїдних мембранах вищих рослин

Тилакоїдні мембрани збагачені білковими і пігмент-білковими комплексами, за посередництва яких відбуваються світлові реакції фотосинтезу. Пігмент-білкові комплекси вкривають близько 80% площі тилакоїдної мембрани (Kirchhoff, 2008).

Диференціація на гранальні і стромальні області виявляє просторову сегрегацію і нерівномірний розподіл фотосинтетичних комплексів у мембрані. В області гран зосереджені переважно ФСII і світлозбиральні комплекси ФСII (СЗКII) (Allen, Forsberg, 2001). ФСI, світлозбиральний комплекс фотосистеми I (СЗКI), локалізовані головним чином в маргінальних, не стиснутих ділянках гран або в ламелах строми, а АТФазний комплекс локалізований в основному в тилакоїдах строми (Albertsson, 2001; Allen, Forsberg, 2001). Цитохромний комплекс b_6/f , який отримує електрони від ФСII через пластохінол і передає їх до ФСI, відновлюючи пластоціанін або цитохром c_6 , знаходять в обох типах тилакоїдних мембран (Allen, Forsberg, 2001).

Організація ФСII – СЗК II (ФСII-S) суперкомплексів в гранях. ФСII – великий мульти-субодиничний пігмент-білковий комплекс, ево-

люційно консервативний як у структурному так і у функціональному аспектах. Його знаходять в тилакоїдних мембранах в усіх кисневих фотосинтетиків – зелених рослин, водоростей і ціанобактерій. Це єдиний білковий комплекс, здатний розщеплювати воду на молекулярний кисень, протони і електрони. ФСII є інтегральним мембранним протеїном, тобто пронизує тилакоїдну мембрану від люмена до строми. Люменальну і стромальну частини ФСII ще називають донорною і акцепторною сторонами, відповідно. У вищих рослин ФСII складається з двох частин: ядра комплексу (core complex), дуже консервативного у всіх окисневих фотосинтетиків, з кофакторами електронного транспорту та внутрішньою антенною, і периферійною антенною системою, що оточує ядро комплексу (Croce, van Amerongen, 2011). У вищих рослин і ціанобактерій ядро комплексу ФСII звичайно функціонує як димер з молекулярною масою 1400 кД (Dekker Voekema, 2005; Caffarri et al., 2009). Мономер ФСII містить близько 40 різних білків, більшість з яких є постійною частиною структури, а інші експресуються або асоціюються з ним при стресі чи деградації (Shi et al., 2012).

У ядро комплексу вбудовані фотосинтетичні реакційні центри (РЦ). РЦ ФС II складається з білків D1 і D2 та цитохромів b_{559} . До ядра комплексу відносять РЦ і α - (PsbE) і β - (PsbF) субодиниці з кофакторами переносу електрона, внутрішню, або ядерну антену (CP43 і

CP47) і три периферійні білки (PsbO, PsbP, PsbQ). Ядро є мінімальною одиницею, здатною окиснювати воду і відновлювати пластохінон (Mamedov et al., 2015). Головні компоненти ядра ФСII можна розподілити на три групи. Первинний донор електронів – фотохімічно активний пігмент P680 зв'язаний з білками D1 (PsbA) і D2 (PsbD) реакційного центру, де відбувається розділення зарядів і первинні реакції перенесення електрона. З РЦ зв'язані шість молекул Хл *a* і дві – феофітину *a* (Dekker, Boekema, 2005). Білки CP47 (PsbV) і CP43 (PsbC) мають дуже подібну структуру, виконують функцію внутрішньої антени, передаючи енергію електронного збудження з периферійної антени до первинного донора електронів. З CP43 зв'язано 13 молекул Хл *a* і 2-3 β -каротину, а CP47 зв'язує 16 молекул Хл *a* і не менше двох – β -каротину (Dekker, Boekema, 2005).

Периферійна антенна система відіграє вирішальну роль в світлоборі, передачі поглинутої енергії до реакційних центрів і фотопротекторних механізмах нефотохімічного гасіння (NPQ) за умов надлишку світла. Антенна система у вищих рослин складається з поліпептидів, що належать до мультигенної родини білків СЗК. Це хлорофіл *a/b*-зв'язуючі протеїни (chlorophyll *a/b*-binding proteins, CABs), протеїни, індуковані світлом високої інтенсивності (high light-induced proteins, HLIPs), ранні протеїни індуковані світлом (early light-induced proteins, ELIPs), psbS білок ФСII, стрес-індуковані білки (stress-enhanced proteins, SEPs) (Dittami et al., 2010). У вищих рослин генні продукти CAB кодуються ядерним геномом і позначаються як Lhcb і Lhca для ФСII і ФСI, відповідно (Jansson, 1999). Білки СЗК синтезуються в цитозолі, постррансляційно імпортуються в хлоропласт і вбудовуються в тилакоїдні мембрани. Взагалі, фотосинтетичні пігменти не зв'язані з білками ковалентно. Периферійну антену ФСII прийнято розділяти на дві частини.

Головний світлозбиральний комплекс (голСЗК, голСЗКII), наймасовіший білок в фотосинтетичній мембрані і відповідно найпоширеніший мембранний білок узагалі, зв'язує ~ 60% хлорофілів ФСII (Peter, Thornber, 1991). Апопротеїн голСЗК складається з трьох субодиниць Lhcb1, Lhcb2 і Lhcb3, які формують гомотримери Lhcb(1)₃ і Lhcb(2)₃ або гетеротример Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3 зі змінною стехіометрією, залежно від умов оточення або виду рослин (Jackowski et al., 2001; Standfuss, Kuhlbrandt, 2004). Lhcb1 і Lhcb2 мають дуже подібну первинну структуру і пігментний склад (Zhang et

al., 2008), а Lhcb3 трохи відрізняється (Standfuss, Kuhlbrandt, 2004). У *Arabidopsis* п'ять генів кодують ізоформи Lhcb1, три гени кодують ізоформи Lhcb2 і один ген кодує Lhcb3. Головний світлозбиральний комплекс ФСII позначають переважно просто СЗКII або СЗКIIb (Thornber, Highkin, 1974), однак іноді всю антенну систему ФСII позначають також СЗКII, а суперкомплекс фотосистеми II – ФСII-СЗКII або ФСII-S. Структура тримерних голСЗКII отримана з розділенням 2,7 і 2,5 Å (Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005). Кожна субодиниця голСЗКII тримера зв'язує вісім молекул Хл *a* і 6 молекул Хл *b*.

Другу частину периферійної антени складають мономерні мінорні антени або мінорні світлозбиральні Хл *a-b* і ксантофіл-зв'язуючі протеїни: Lhcb4 (CP29), Lhcb5 (CP26) і Lhcb6 (CP24). Іншим важливим компонентом тилакоїдних мембран в області гран є PsbS білок, який відносять до СЗК або СЗК-подібних білків (Funk et al., 1995; Montané, Kloppstech, 2000). Часом його відносять до ядра комплексу ФСII, хоча PsbS ніколи не знаходили в кристалах ФСII (Dekker, Boekema, 2005; Nield, Barber, 2006). Схоже, що PsbS не зв'язує хлорофіл, тобто, на відміну від більшості продуктів Lhc-родини генів, стабільний у відсутності пігментів (Dekker, Boekema, 2005). PsbS відіграє важливу роль в нефотохімічному гасінні флуоресценції хлорофілу (Niyogi et al., 2005). У більшості випадків, в області стекингу тилакоїдів ФСII організовані в ФСII-СЗКII суперкомплекси (ФСII-S). Вони складаються з димерів ядра комплексу з мінорними світлозбиральними комплексами, та двох голСЗКII(S) міцно зв'язаних тримерів (S тримери) з боку CP43 і CP26 (Nield et al., 2000). Суперкомплекс C2S2 є базовою одиницею ансамблів ФСII-S. Ще два голСЗКII(M) можуть бути помірно міцно (M тримери) зв'язані з ядром ФСII за рахунок контактів з CP29 і CP24 утворюючи C2S2M2 суперкомплекс (Dekker, Boekema 2005). Окрім міцно (S) та помірно міцно (M) зв'язаних голСЗКII з даним димером ядра (C2) вирізняють також і слабо зв'язані голСЗКII(L) (Boekema et al., 1999). Міцність відповідних місць зв'язування оцінюють по частоті утримання голСЗКII комплексів при частковій солюбілізації тилакоїдів гран і позначають як 'S' (strongly), 'M' (moderately) і 'L' (loosely) (Boekema et al., 1999). Взаємодія між комплексами насправді не надто міцна, оскільки суперкомплекс ФСII-S дезагрегує при обробці дуже м'якими детергентами, тоді як суперкомплекс ФСII-LHCI в таких умовах залишається інтактним (Ballottari et al.,

ВАРІАЦІЯ СПІВВІДНОШЕННЯ ВМІСТУ ХЛОРОФІЛІВ *a* І *b*

2004), тобто сила взаємодії ядра і ЛНС комплексів в ФСІ і ФСІІ суттєво різняться.

Субодиноці СЗК організовані двома шарами навколо ядра ФСІІ: внутрішній складають CP29, CP26 і один голСЗКІІ(S) (Morosinotto et al., 2006). Зовнішній шар ФСІІ-S формують CP24, голСЗКІІ(M) та голСЗКІІ(L) тримери (Bailey et al., 2001).

Загалом було виявлено кілька композицій ФСІІ-S зокрема C2S2, C2S2M2 і C2S2M2Lx (Daum et al., 2010; Kouřil et al., 2012). Так, суперкомплекс у шпинаті може приєднувати 1-2 L-тримери C2S2M2L1-2. Однак 'L' тримери зустрічаються, загалом, досить рідко (Yakushevskaya et al., 2003). Існують біохімічні докази того, що в тилакоїдній мембрані на один димер ядра ФСІІ може припадати до восьми тримерів СЗК ІІ (van Oort et al., 2010; Duffy et al., 2013; Kouřil et al., 2013).

C2S2 суперкомплекс – найбільш виражена форма ФСІІ в хлоропластах, адаптованих до високої інтенсивності світла. При низькій інтенсивності світла приєднуються додаткові голСЗКІІ, формуючи великий суперкомплекс ФСІІ-S (C2S2M2Lx) (Betterle et al., 2009). Частина голСЗКІІ(L) тримерів може фосфорилуватися і мігрувати до ФСІ, в процесі "state transitions" (ST) переходів для перерозподілу надходження енергії збудження до ФСІ і ФСІІ. Антена ФСІ збагачена Хл *a* і поглинає в більш довгохвильовій області ніж ФСІІ, яка містить значну частку Хл *b*. У зв'язку з цим фотосистеми можуть збуджуватися з різними швидкостями залежно від якості світла, що може розбалансовувати електрон-транспортний ланцюг. Міграція голСЗКІІ до ФСІ приводить до зміни перерізів поглинання ФСІ і ФСІІ і відновлює баланс збудження фотосистем. У стані 1 (S1), збуджується переважно ФСІ і всі голСЗКІІ асоційовані з ФСІІ (Torchiy et al., 2005). Коли світло збуджує переважно ФСІІ, мобільний пул голСЗКІІ рухається від ФСІІ і асоціюється з ФСІ, що визначається як стан 2 (S2) (Allen, 1992). Традиційно ST відносять до швидкого типу фотоадаптації у рослин.

Ступінь формування суперкомплексів і латеральна гетерогенність динамічно регулюються у відповідь на впливи середовища в процесах ST-переходів і репарації ФСІІ, у яких фосфорилування голСЗКІІ або ФСІІ корелює з частковою або повною дисоціацією суперкомплексів і міграцією фосфорильованих білків в ламели строми або маргінальні області гран (Tikkanen, Aro, 2012).

Таким чином, організація фотосинтетичних комплексів ФСІІ в ділянках стекінгу гран вищих рослин дуже гнучка і чутлива до зовнішніх умов, що надзвичайно важливо для оптимізації ефективності фотосинтезу в мінливому природному середовищі.

Організація фотосинтетичних комплексів у ламелах (тилакоїдах строми)

Грани зв'язані між собою ламелами (стромальними тилакоїдами). У них міститься більшість комплексів ФСІ і АТФсинтази та мономери ФСІІ, що перебувають в циклі репарації (Aro et al., 2004). ФС І є найбільш ефективним перетворювачем світлової енергії в природі з відношенням числа генерованих електронів до поглинутих фотонів, близьким до 1 (Nelson, 2009). Подібно до ФСІІ структура ФСІ може бути розділена на дві головні групи: ядро і периферійну антену (LHCI).

У вищих рослин ядро комплексу ФСІ складають дві великі субодиноці, гетеродимер (PsaA/PsaB), чотири зовнішні субодиноці (PsaC-E і PsaN) та ряд малих внутрішніх субодиноць (PsaF, PsaI-PsaL, PsaG-H і PsaO) (Dekker, Boekema, 2005). У вищих рослин комплекс ФСІ є мономером. Пігменти асоційовані головним чином з двома великими субодиноцями PsaA і PsaB, а малі субодиноці зв'язують незначну кількість молекул Хл. Більшість молекул Хл, зв'язаних з субодиноцями РЦ, виконує функцію внутрішньої антени. Периферичну антену ФСІ (СЗКІ) складають світлозбиральні пігмент-білкові комплекси, які кодується в ядрі. До СЗКІ входять в основному чотири поліпептиди (Lhca1-4), а Lhca5 і Lhca6 присутні в тилакоїдних мембранах у незначних кількостях за всіх тестованих умов (Ganeteg et al., 2004; Storf et al., 2005). Комплекси периферичної антени приєднуються до ядра комплексу ФСІ як функціональні димери Lhca1/4 і Lhca2/3 (Wientjes, Croce, 2011). Властивості окремих мономерів LHCI істотно відрізняються, однак багато біохімічних і спектральних властивостей дуже схожі. Зокрема, величина співвідношення Хл *a/b*, визначена біохімічними методами, для Lhca1 – 4,0, Lhca3– 6,2, Lhca2 – 1,85, Lhca4 – 2,3, а для димерів Lhca1/4 і Lhca2/3 воно приблизно дорівнює 3,7 (Castelletti et al., 2003; Wientjes, Croce, 2011).

Структура ФСІ-LHCI суперкомплексу у вищих рослин отримана з роздільною здатністю 2,6 Å, що дало змогу детально ідентифікувати кофактори (Mazor et al., 2017). Структуру ФСІ складають 16 білків, більшість з яких – інтегральні мембранні протеїни, які зв'язують бі-

Таблиця 2. Вміст і співвідношення хлорофілів в комплексах фотосистем (ФСII і ФСI) та тилакоїдній мембрані загалом за різної стехіометрії ФСII / ФСI (Standfuss et al., 2005; Krüger et al., 2013; Pan et al., 2013; Passarini et al., 2014; Qin et al., 2015).

Компоненти фотосинтетичного апарату	Хл a	Хл b	Хл a/b
ФСII			
(D1/D2)	6		
	2 (Фео)		
CP47	16		
CP43	13		
мінорні Lhcb (CP24+CP26+CP29)	19	13	1,46
Мономер голСЗКII (Lhcb1...3)	8	6	1,33
C2S2 (C2 /2 мінорні Lhcb / S2)	156	62	2,52
C2S2M2	204	98	2,08
C2S2M2L2	252	134	1,88
C2S2M2L4	300	170	1,76
ФСI			
Ядро ФСI Psa(A,B,F,G,J,K,L)	98		
СЗК I (Lhca1/4–Lhca2/3)	45	12	3,75
ФСI-СЗКI	143	12	11,92
ФСI-СЗКI–голСЗКII	167	30	5,57
ФСII+ФСI			
ФСII / ФСI =1	299	74	4,04
C2S2–ФСI-СЗКI			
ФСII / ФСI =1	323	92	3,51
C2S2–ФСI-СЗКI–голСЗКII			
ФСII / ФСI =1	347	110	3,15
C2S2M2–ФСI-СЗКI			
ФСII / ФСI =1	371	128	2,90
C2S2M2–ФСI-СЗКI–голСЗКII			
ФСII / ФСI =1	395	146	2,71
C2S2M2L2–ФСI-СЗКI–голСЗКII			
ФСII / ФСI =2	671	298	2,25
2{C2S2M2L2}–ФСI-СЗКI–голСЗКII			
ФСII / ФСI =2	767	370	2,07
2{C2S2M2L4}–ФСI-СЗКI–голСЗКII			
ФСII / ФСI =2	791	388	2,04
2{C2S2M2L4}–ФСI-СЗКI–2голСЗКII			
ФСII / ФСI =4	1391	728	1,91
4{C2S2M2L4}–ФСI-СЗКI–2голСЗКII			

льше 200 кофакторів, включно з 155 хлорофілами і 35 каротиноїдами. Субодиниці LHCI (Lhca1 – Lhca4), зв'язують 57 хлорофілів – 45 Хл a і 12 Хл b (табл. 2) (Qin et al., 2015).

Концентрація пігментів у ядрі комплексу ФСI значно вища ніж у ФСII, оскільки в них міститься відповідно 98 і 35 молекул Хл, в дуже близькій кількості. В ФСI, на відміну від ФСII, тільки по одній копії Lhca1-4 приєднуються до ядра комплексу ФСI, і стехіометрія LHCI/ФСI не змінюється при адаптації до різної інтенсивності світла (Ballottari et al., 2007). Порівняно з ФСII-S суперкомплекс ФСI-S (ФСI-LHCI) є значно менш гнучким у відповідях на зміни умов середовища. ФСI взагалі дуже стабільна і фотоінактивується тільки за відсутності акцепторів електрона (Sonoike, 2011).

Світлозбиральна функція ФСI регулюється в основному за рахунок змін співвідношення ФСI/ФСII і асоціації пігмент-білків Lhcb (голСЗКII) з ФСI (Ballottari et al., 2007; Bonente et al., 2012). В умовах, коли збуджується переважно ФСII, частина голСЗКII рухається до ФСI, збільшуючи розмір її антени з формуванням суперкомплексу ФСI-LHCI-голСЗКII (Lemeille, Rochaix, 2010). Цей процес розглядали як швидку адаптацію, що підтримує баланс збудження фотосистем при раптових змінах інтенсивності і кольору світла. Однак було показано, що і в процесі тривалої адаптації частина голСЗКII асоційована з ФСI (Wientjes et al., 2013). Так, при освітленні ~ 100 мкмоль $m^{-2} s^{-1}$ близько половини ФСI асоціювали по одному голСЗКII, кількість яких зростала за низької інтенсивності світла і зменшувалася за високої.

ВАРІАЦІЯ СПІВВІДНОШЕННЯ ВМІСТУ ХЛОРОФІЛІВ *a* І *b*

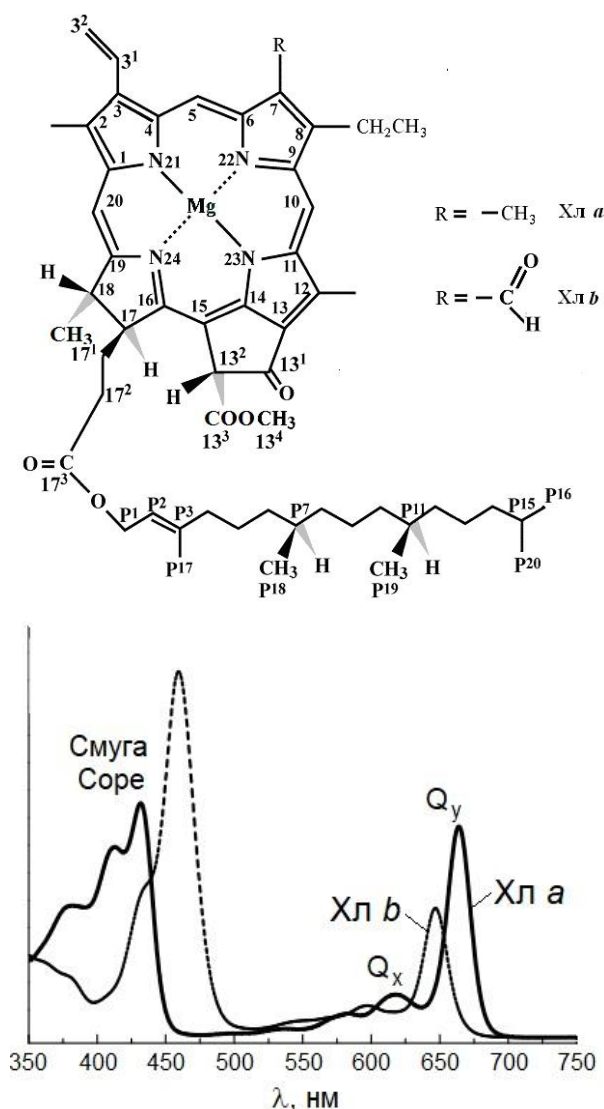


Рис. 3. Будова молекул хлорофілів *a* і *b* та спектри їх поглинання.

Хоча відношення ЛНСІ/ФСІ не змінюється при варіації інтенсивності світла, однак зміна кількості голСЗКІІ, асоційованих з ФСІ, змінює розмір обох фотосистем (Wientjes et al., 2013). У вищих рослин всі голСЗКІІ зв'язані з ФСІІ в стані 1 (S1) тоді як в S2, який індукується перезбудженням ФСІІ, частина (~15%) голСЗКІІ переходить до ФСІ (Kouřil et al., 2005). Зокрема, у рослин був ізольований стабільний ФСІ-ЛНСІ-голСЗКІІ суперкомплекс, який утворюється в процесі ST-переходів при фосфорилуванні голСЗКІІ(L) (Galka et al., 2012). Хоча фосфорилуються не тільки голСЗКІІ(L), а й інші голСЗКІІ в ФСІІ-S, для міграції до ФСІ цього недостатньо (Wientjes et al., 2013).

У мембранах вищих рослин зміну стехіометрії ФСІІ/ФСІ спричиняють редокс-сигнали, які генеруються при дисбалансі світлового збу-

дження ФСІІ і ФСІ (Kim et al., 1993). Якість світла також впливає на стехіометрію ФСІІ/ФСІ (Pfannschmidt et al., 1999). Відношення ФСІІ/ФСІ варіювало від 1,1-1,9 при опроміненні світлом 550-660 нм (переважно збуджує ФСІІ) і зростало до 2,2-4,0 при опроміненні рослин світлом >660 нм (переважно збуджує ФСІ) (Chow et al., 1990; Fan et al., 2007). Загальна кількість фотосистем в хлоропласті, відношення ФСІІ/ФСІ, число світлозбиральних антен відносно реакційних центрів тісно пов'язане з умовами освітлення (Tikkanen et al., 2012; Kouřil et al., 2013). У табл. 2 наведено вміст Хл у різних пігмент-білкових комплексах і співвідношення Хл *a/b* за різної композиції (включно з гіпотетичною) фотосистем і відношеннях ФСІІ/ФСІ. Відношення ФСІІ/ФСІ в листках значно вищі від одиниці, завдяки більшій кількості функціональних ФСІІ ніж ФСІ (Fan et al., 2007). Мінімальним граничним значенням Хл *a/b* є 1,91 для гіпотетичної мембрани, в якій на чотири димери ядра комплексу ФСІІ, кожен з яких асоційований з вісьмома тримерами СЗК ІІ, припадає лише один димер ФСІ із СЗК І, а зв'язок між фотосистемами забезпечують два комплекси голСЗКІІ.

Навряд чи можливо уявити стехіометрію пігментних комплексів у функціональному фотосинтетичному апараті, яка б відповідала співвідношенню Хл *a/b* < 1,91. Однак у літературі досить часто зустрічаються показники, нижчі за це значення, отримані при визначенні пігментного складу рослин дикого типу, як за умов стресу, так і звичайних. Виходячи з сучасних знань про будову фотосинтетичного апарату, що спираються на дані рентгеноструктурного аналізу, такі значення співвідношення Хл *a/b* слід розглядати як артефакти.

Метаболізм хлорофілів

Хлорофіли належать до тетрапірольних сполук. Протяжна делокалізована ароматична система хлорофілового макроциклу зумовлює типові спектри поглинання в ультрафіолетовій і видимій ділянках спектра (рис. 3).

Хоча шлях біосинтезу Хл *a* був розшифрований до 1963 р., ключовий ензим біосинтезу Хл *b* був виявлений тільки у 1998 р. Показано, що Хл *b* утворюється з Хл *a* за участю хлорофілід *a* оксигенази (ХлаО) (Tanaka et al., 1998; Espineda et al., 1999). Метаболізм Хл можна розділити на три основні етапи: синтез Хл, хлорофіловий цикл та деградацію хлорофілу (рис. 4).

Синтез Хл в пластидах починається з утворення 5-амінолевулінової кислоти (ALA) з

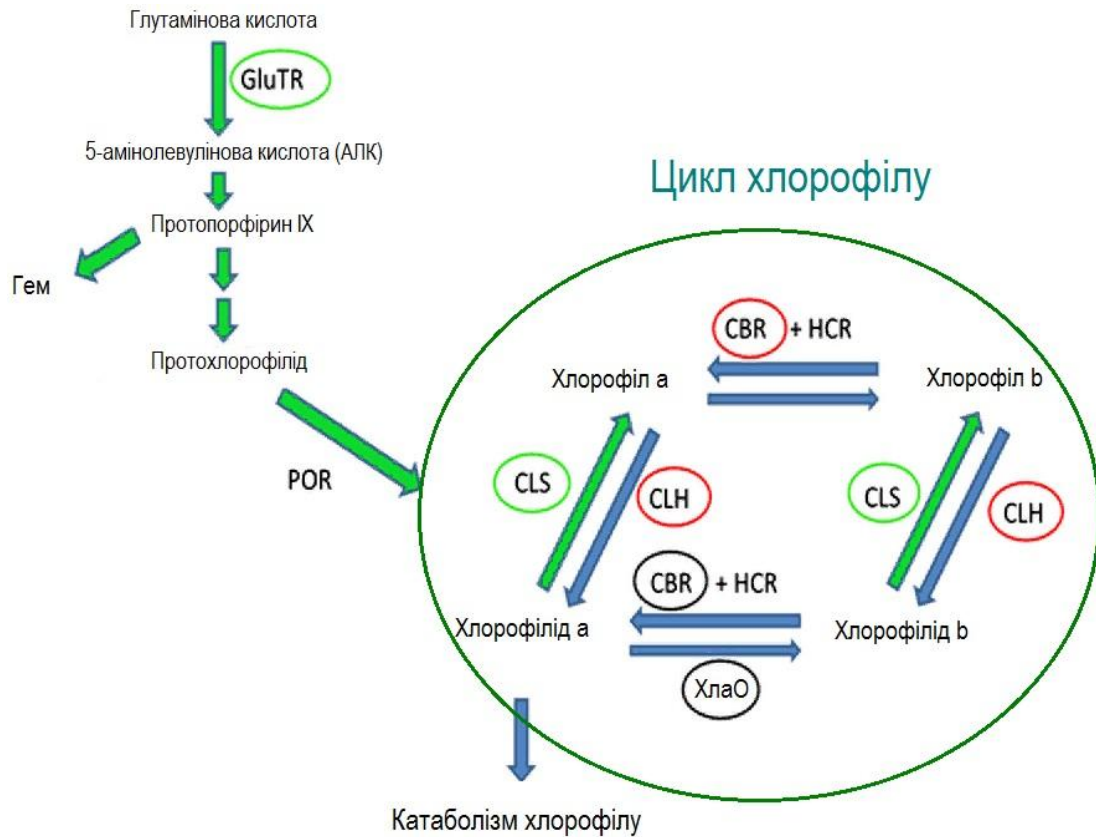


Рис. 4. Схема метаболізму хлорофілу.

Для побудови рис. використані дані роботи Rosianskey et al., 2016.

GluTR – глутаміл тРНК редуктаза; ХлаО – хлорофілід а оксигеназа; CLS – хлорофілсинтаза; CBR – хлорофіл b редуктаза; CHL – хлорофілаза; HCR – 7-гідроксиметилхлорофіл редуктаза; POR – протохлорофілід оксидоредуктаза.

глутамату за участю глутаміл тРНК редуктази (GluTR). За участю протохлорофілід редуктази (POR) протохлорофілід трансформується у хлорофілід. Завершальним етапом синтезу Хл є введення тетрапренілового (фітильного або геранілгераніолового) бічного ланцюгу, що каталізується хлорофілсинтазою (CLS). Зворотня реакція каталізується хлорофілазою (CHL). Другою стадією метаболізму Хл є хлорофіловий цикл. На цьому етапі відбувається взаємоперетворення між хлорофілом *a* і *b*, що контролюється активністю трьох ензимів: хлорофілід *a* оксигенази (ХлаО), хлорофіл *b* редуктази (CBR) і 7-гідроксиметилхлорофіл редуктази *b* (HCR). Третій етап метаболізму хлорофілу – це його деградація, яка починається з видалення центрального атома Mg за допомогою Mg-дехелатази або відділення нециклічного дитерпену фітолу за участю хлорофілази (CHL) (Сиваш, Золотарева, 2013).

Хл *a* і *b* мають однакові структури за винятком замісника в положенні C₇, який у Хл *a* є метильною групою, а у Хл *b* – формільною (рис. 3). Подвійний зв'язок у формільній групі Хл *b* входить у супряження з системою перемі-

жних подвійних зв'язків π-електронної системи макроциклу й істотно впливає на спектральні властивості пігменту. Зокрема, значно зменшується питоме поглинання в Q-смузі Хл *b* і відбувається її зрушення у блакитну область. Хл *a* має блакитний відтінок, а Хл *b* – виражений зелений колір. Хл *b* у складі СЗКІ, СЗКІІ і периферичної антени, залежно від умов освітлення, бере участь у збільшенні світлозбору на низькому світлі і в дисипації надлишку поглиненої світлової енергії на високому світлі. Він також необхідний для правильного складання і стабільності антенних комплексів і для підтримання надмолекулярної організації тілакоїдних мембран.

Біосинтез хлорофілу b. Припускали, що біосинтез обох типів Хл відбувається переважно одним шляхом, а модифікація конкретного бічного ланцюга забезпечується в короткій додатковій послідовності реакцій. Протягом довгого часу відомо, що після опромінення етіолованих рослин спочатку утворюється Хл *a*, і лише згодом – Хл *b*. Ця закономірність була підтверджена в експериментах з радіоактивною міткою (¹⁴CO₂) та іншими маркерами (Bogorad,

1976). Був зроблений висновок, що біосинтез Хл *b* повинен включати перетворення 7-метильної групи у 7-формільну. Schneegurt і Beale (1992) першими на прикладі *Chlorella vulgaris* продемонстрували за допомогою $^{18}\text{O}_2$, що кисень формільної групи в Хл *b* утворюється з O_2 . Результати цих та подібних експериментів, виконаних з іншими видами рослин, вказують на участь діоксигеназного або монооксигеназного механізму в біосинтезі Хл *b*, але не показують, чи відбувається ця реакція з самим Хл *a* або з будь-яким з його попередників. Це питання вирішувалося в експериментах з Хл *b*-дефіцитними мутантами та рекомбінантними ензимами.

Хлорофілід – оксигеназа (ХлаО). Щоб знайти гени, відповідальні за утворення Хл *b*, Tanaka і співавт. (1998) використали мутанти *Chlamydomonas reinhardtii*, позбавлені Хл *b*. Селективними маркерами для інсерційного мутагенезу були або нітратредуктаза, або гени аргінінсукцинатліази. Espineda та ін. (1999) використовували консервативні послідовності гена ХлаО з *Chlamydomonas* для клонування гомологічного гена (*AtХлО*) з *Arabidopsis thaliana*. Автори виявили, що експресія гена реагує на адаптацію рослин до різних умов освітлення, оскільки рівень мРНК *AtХлО* знижувався при переведенні рослин з середньої інтенсивності освітлення ($60 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) на дуже низьку ($5 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$), і це зниження рівня мРНК було оборотним. Важливим результатом дослідження була кореляція між дефіцитом Хл *b* та порушенням гена ХлаО, особливо з втратою фрагмента ДНК, відповідного 40 амінокислотам у білку *AtХлО*, у позбавленого Хл *b* мутанта *chl-3*. Наявність тільки одного-єдиного гена, необхідного для біосинтезу Хл *b*, пояснює більш ранні генетичні дані, які показали, що мутанти ячменю і *Chlamydomonas*, повністю позбавлені Хл *b*, належать до однієї комплементарної групи (Simpson et al., 1995), на відміну від регулярних мутантів зі зниженим вмістом Хл *b*.

У біохімічних дослідженнях механізму реакції утворення Хл *b* використовували рекомбінантний ензим (Oster et al., 2000). Як і очікувалося, для перебігу реакції був потрібен кисень і кофактор як відновник. Реакцію проводили в присутності фередоксину, що підтримувався у відновленому стані за допомогою НАДФН: фередоксин-оксидоредуктази і системи регенерації НАДФН. При використанні хлорофіліду *a* як субстрату, продуктом ензиматичної реакції був хлорофілід *b* і сліди 71-ОН-

хлорофілід *a*, в той час як при використанні цинк-вмісного аналогу Zn-феофорбіду *a* продуктами реакції були відповідні сполуки цинку Zn-феофорбід *b* і Zn-71-ОН-феофорбід *a*. Найкращий вихід Zn-феофорбіду *b* був отриманий з Zn-71-ОН-феофорбіду *a* як субстрату. Цей факт, а також кінетичні дані, які показали типове накопичення кінцевого продукту тільки для похідних Хл *b*, дозволили ідентифікувати 71-ОН сполуки як проміжні продукти оксигеназної реакції. Таким чином, була доведена двостадійність оксигеназної реакції, каталізованої продуктом гена ХлаО. Тести з протохлорофілідом *a* і естерифікованим Хл *a* були негативними, показуючи, що хлорофілід *a* не є належним субстратом для ензиму (Rüdiger, 2002).

Якщо біохімічні властивості рекомбінантного ензиму відповідають характеристикам ензиму *in situ*, це може вважатися генетичним доказом того, що лише один ензим є відповідальним за біосинтез Хл *b*. Цей висновок, доповнений результатами дослідження мутантів, які показали, що не існує альтернативних шляхів біосинтезу Хл *b*, дозволяє вважати неестерифікований хлорофілід *a* обов'язковим попередником біосинтезу Хл *b*. Однак у даний час не можна виключити, що субстратна специфічність ХлаО може бути модифікована *in vivo* при взаємодії з білками. Така модифікація активності ХлаО в СЗК вже була продемонстрована (Xu et al., 2001). Два типи тетрапіролів, Хл *b* і фікобіліни, є типовими антенними пігментами в організмах з оксигенним фотосинтезом. Примітно, що для утворення обох типів тетрапіролів потрібен молекулярний кисень. Таким чином, можна припустити, що біосинтез Хл *b* і фікобілінів розвинувся після формування кисневого фотосинтезу. Для вирішення питання про еволюційне походження гена ХлаО були вивчені гени або пластидна ДНК з організмів різного еволюційного положення. Вирівнювання виведених амінокислотних послідовностей, включаючи *Chlamydomonas reinhardtii* (Tanaka et al., 1998), показало від 51 до 83% ідентичності для будь-яких двох послідовностей, при цьому у всіх послідовностей були присутні два типові мотиви для [2Fe-2S] Ріске і для центру зв'язування феруму. Крім того, вирівнювання показало в цілому вісім пропусків в амінокислотних послідовностях, які були або характерними для одного з досліджених таксонів, або були присутні в кількох, але не у всіх вивчених видах. Автори запропонували використовувати ці пропуски як філогенетичні маркери. Високий ступінь гомології амінокислотних послідовностей демонструє, що один і той самий ензим бере

участь у біосинтезі Хл *b* у таких віддалених організмах як *Prochlorophyta* і вищі рослини. Це виключає можливість багаторазового виникнення шляху біосинтезу Хл *b* в еволюції рослин.

У хлоропластах біосинтез Хл *b* пов'язаний із синтезом Хл *b*-зв'язуючих білків. Показано, що надекспресія гена ХлаО в *A. thaliana* призводить до збільшення рівня Хл *b* і зменшення співвідношення Хл *a/b* у зрілих рослин з 2,85 до 2,65 і збільшення приблизно на 20% периферичного світлозбирального комплексу (СЗК II) щодо антенного комплексу ядра ФСII (Tanaka, Tanaka, 2011). Надекспресія ХлаО з *A. thaliana* в *Synechocystis* sp. PCC6803 мала наслідком утворення Хл *b* до приблизно 10% від загальної кількості Хл у цьому організмі, який зазвичай не містить Хл *b* (Satoh et al., 2001). Хл *b* переважно містився в комплексі P700 і активно переносив світлову енергію на Хл *a*. Значно більше Хл *b* (до 80% загальної кількості Хл) акумулювалося в *Synechocystis* sp. PCC6803 при включенні в геном цієї ціанобактерії, разом з геном ХлаО, генів вищих рослин, що кодують СЗК II (Xu et al., 2001). Несподіваним результатом цього дослідження була відсутність накопичення білка СЗК II. У штамі *Synechocystis*, позбавленому ФС I, який використовувався для цієї трансформації, накопичений Хл *b* змінив більшу частину Хл *a* у всіх компонентах ФС II без втрати фізіологічної активності цього комплексу. Молекулярний механізм стимуляції ензиматичної активності ХлаО при зв'язуванні з СЗК ще належить з'ясувати.

Цикл хлорофілу. Відновлення Хл *b* до Хл *a*, гідроліз Хл *a* до хлорофіліду *a* і біосинтез Хл *b* з хлорофіліду *a* розглядається як циклічний процес (рис. 4). Аналогічно ксантофілового циклу, Ito і Tanaka (1996) назвали його «циклом хлорофілу». Цикл починається і закінчується хлорофілідом *a*. Біосинтез обох Хл здійснюється через хлорофілід *a*. Для завершення біосинтезу Хл потрібно тільки етап естерифікації, що каталізує Хл-синтаза. Біосинтез Хл *b* з хлорофіліду *a* включає дві стадії: реакцію за участю продукту гена ХлаО – хлорофілід-оксигенази, і наступну стадію естерифікації. Подібно до ксантофілового циклу, цикл Хл не завжди проходить повністю. Його функція, як вважають, полягає в забезпеченні фотосинтезу або Хл *a*, або Хл *b*, залежно від конкретної фізіологічної потреби, і задоволенні цієї потреби за рахунок попередньо синтезованих Хл. Таким чином, рослини можуть потенційно використовувати реакції циклу Хл для коригування співвідношення

Хл *a/b* в різних фізіологічних і екологічних умовах.

Весь набір реакцій взаємоперетворення між хлорофілом *a* та хлорофілом *b* представлений на рис. 4. У зворотній реакції Хл *b* → Хл *a*, 7-формільна група хлорофілу *b* спочатку відновлюється до гідроксильної групи за участю хлорофіл *b*-редуктази, яка належить до надродина коротколанцюгових дегідрогеназ. Ця проміжна сполука являє собою 7-гідроксиметилхлорофіл *a* (НМChl), який також є інтермедіатом двоетапної реакції, що каталізується ХлаО. Потім НМChl відновлюється до хлорофілу *b* за допомогою ензиму НМChl-редуктази (НСAR), який ще не охарактеризований. У рослин є дві ізоформи хлорофілу *b* редуктази, що відповідно називаються NYC1 та NOL (Sato et al., 2009). Ізоформа NYC1 має, як припускають, три мембранні домени, тоді як NOL не містить трансмембранних частин. У рослинах рису NYC1 та NOL функціонують як гетеродимери. Ця модель ґрунтується на спостереженні, що у мутантів рису, які не мають NYC1 або NOL, знижена активність хлорофіл *b* редуктази при старінні листя. Крім того, взаємодія NYC1 та NOL була підтверджена експериментами із застосуванням імунокопреципітації *in vitro* з рекомбінантними білками NYC1 та NOL (Sato et al., 2009). Оскільки рекомбінантний ензим NOL показав *in vitro* активність хлорофіл *b* редуктази за відсутності NYC1, не виключено, що NOL може функціонувати незалежно від NYC1 (Horie et al., 2009). Висунуто припущення, що утворення гетеродимеру NYC1 і NOL необхідне тільки при певних умовах розвитку, таких як старіння листків (Tanaka, Tanaka, 2011).

Баланс між хлорофілом *a* і хлорофілом *b* може. Існує низка доказів того, що швидкість прямої реакції залежить від співвідношення Хл *a/b* за нормальних умов росту у *Arabidopsis* (наприклад, 23°C, 100 мкмоль м⁻² с⁻¹). Підвищення вмісту білка ХлаО призводить до різкого зниження співвідношення Хл *a/b* від приблизно 3,0 до ≤ 1,0 що відповідає збільшенню вмісту Хл *b* (від 25% до більш ніж 50% від загального вмісту Хл) (Hirashima et al., 2006). На відміну від цього, в мутанті *Arabidopsis*, який не має ні NYC1, ані NOL, співвідношення Хл *a/b* не відрізнялося від рослин дикого типу під час їх вегетативної фази (Tanaka et al., 2011). Ці дані свідчать, що ні NYC1, ані NOL не беруть участі у регулюванні співвідношення хлорофілів за таких умов. Нині NYC1 і NOL, як вважають,

ВАРІАЦІЯ СПІВВІДНОШЕННЯ ВМІСТУ ХЛОРОФІЛІВ *a* І *b*

відіграють важливу роль у циклі Хл лише при активній деградації хлорофілу.

Метаболіти і ензими циклу хлорофілів, перш за все ХлаО, активно досліджуються у зв'язку з їх ймовірною роллю в регуляції старіння листків і рослинного організму в цілому. Хл *b* впливає не тільки на збирання антен, а й на деградацію антенних білків (Сиваш, Золотарева, 2013). Синтез апопротеїнів СЗК II зменшується при початковому старінні, але завдяки відносно високій стабільності ці білки виявляються у листках тільки на його пізніх стадіях. Поки хлорофіли зв'язані з білками, вони не доступні для протеаз (Syvash, Zolotareva, 2017). Катаболізм Хл *b* неможливий без його перетворення на Хл *a* (Сиваш, Золотарева, 2013). Реакція каталізується двома ізоформами ензиму хлорофіл *b* редуктази: non-yellow coloring 1 (NYC1) і NYC1-подібна. З цього етапу починається розбирання СЗК II (Hopkins et al., 2007). NYC1 не накопичується за відсутності Хл *b*; цей білок також не виявляється у мутантів *Arabidopsis*, що не мають Хл *b*. В цілому, синтез і катаболізм Хл *b* регулюються за принципами негативного та позитивного зворотнього зв'язку: при вичерпанні хл *b* ензим ХлаО піддається деградації, що дозволяє клітині підтримувати невисокий вміст пігменту, а для накопичення білка NYC1, навпаки, необхідний Хл *b*.

Особливості мутантів з відсутністю або надекспресією хлорофілу *b*

Велике значення для з'ясування структурно-функціональної ролі Хл *b* та Хл-вмісних білків має аналіз конститутивних і кондиціональних мутантів, у хлоропластах яких Хл *b* або відсутній, або його вміст знижений порівняно з рослинами вихідного генотипу. У конститутивних мутантів синтез Хл *b* заблокований без можливості відновлення, як, наприклад, при пошкодженні ензиму ХлаО при мутації *chl1* у *Arabidopsis* (Reinbothe et al., 2006). Рослини з порушенням біосинтезу Хл *b* мають менший загальний вміст Хл і блідо-зелений колір. У кондиціональних мутантів синтез Хл *b* поновлюється в певних умовах, як, наприклад, у мутанту пшениці *CD3 chlorina* (Allen et al., 1988). Існує два класи мутантів зі зменшеною кількістю Хл *b*: один тип взагалі не має Хл *b*, а інший є Хл *b*-дефіцитним. До першого типу відносять мутант ячменю з синдромом *chlorina fl* (Bellemare et al., 1982) та мутант *Arabidopsis thaliana chl1* (Reinbothe et al., 2006), які не синтезують Хл *b* незалежно від умов освітлення. Оскільки цей тип продукує майже нормальну кількість Хл *a*, вважається, що первинні ура-

ження безпосередньо впливають на біосинтез Хл *b*. Мутанти, що не мають Хл *b*, як правило, не накопичують значних кількостей Хл-зв'язуючих білків СЗК за будь-яких умов (Harrison et al., 1993). Ультраструктура та адгезія областей стекінгу в гранальних тилакоїдах цих мутантів є зміненими порівняно з диким типом (Staehelein, 1996).

Мутант ячменю *Hordeum vulgare*, який не містить Хл *b* – *chlorina f2* – був ідентифікований і охарактеризований Хайкіним та ін. у 1950 р. У цього мутанту, як було встановлено пізніше, відсутній голСЗКII (Thornber, Highkin, 1974). Дефіцит Хл *b*, очевидно, впливає на стійкість поліпептидів з мол. масою 25-30 та 20-25 кДа відповідно, але не змінює рівня відповідних мРНК (Ghirardi et al., 1986). Хлоропласти мутантів *chlorina f2* містять грани, хоча відносна площа області стекінгу мембран істотно зменшується порівняно з їхніми аналогами дикого типу. При зіставленні функціональних характеристик електронного транспорту та пігментного складу комплексів фотосистем у дикому типі та в хлоропластах *chlorina f2 Hordeum vulgare* було показано, що мутант мав істотно менший розмір світлозбиральної антени ФСII. Також було виявлено зменшення розміру антени у ФСI. У мутантних хлоропластів була відсутня диференціація ФС II на ФС II α і ФС II β . Очевидна відсутність гетерогенності ФС II у тилакоїдних мембранах *chlorina f2* свідчить про залучення СЗКII у цю неоднорідність (Ghirardi et al., 1986). Мутантні хлоропласти також показали значне збільшення стехіометричного співвідношення складу ФС II/ФС I. Зростання співвідношення ФС II/ФС I розглядається як відповідь рослини на знижену освітлювальну здатність ФС II в мутантних хлоропластах, що протидіє ефекту мутації та відновлює загальне збалансоване поглинання світла між двома фотосистемами. Нездатність мутанта *chlorina f2* до синтезу Хл *b* має три специфічні наслідки для організації та складу фотосистем:

- (а) суттєве зменшується Хл-вмісна світлозбиральна антена в обох фотосистем;
- (б) змінюється стехіометрія реакційних центрів ФС II та ФС I;
- (в) зникає гетерогенність ФС II.

Відсутність Хл *b* у мутанті *chlorina f2* ячменю призводить до зменшення розміру функціональної антени ФС I від 185 Хл (*a* + *b*) у дикого типу до приблизно 150 Хл *a* у мутанті, тобто антена зменшується приблизно на 20% у кількості молекул Хл, специфічно пов'язаних з ФС I.

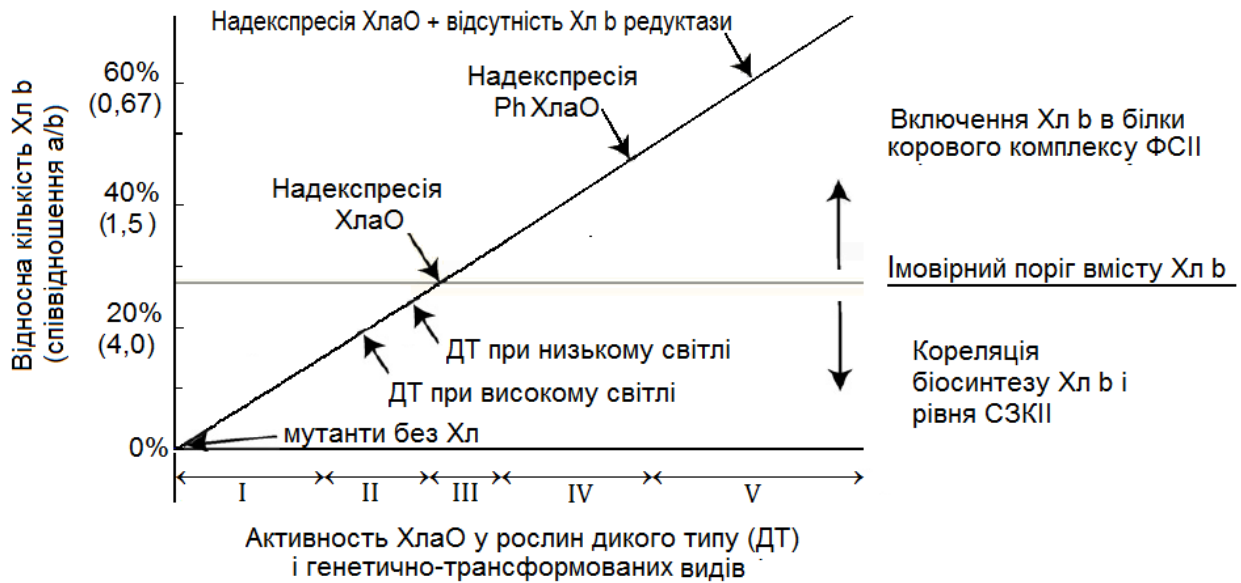


Рис. 5. Взаємозв'язок між удаваним перетворенням хлорофілу $a \rightarrow b$ і його впливом на рівень СЗК та ектопічним включенням Хл b в пігмент-білкові комплекси.

Графік був побудований на підставі досліджень мутантів *chlorinal* та різних трансгенних рослин, що експресують ХлаО, а також рослин дикого типу (ДТ), вирощених за умов низького або високого освітлення (використані результати робіт: Hirashima et al., 2006; Tanaka, Tanaka 2011; Sakuraba et al., 2012). На осі Y показана частка хлорофілу b у загальному вмісті хлорофілу.

Фаза I на осі X. Якщо активність ХлаО порушена, як у мутанта *chlorinal*, то співвідношення Хл a/b складає більше 4 (вміст хлорофілу b менше 20%).

Фаза II. При адаптації рослин дикого типу до інтенсивності світла активність ХлаО може змінюватися в межах певного діапазону, і це зазвичай призводить до співвідношення Хл a/b від 4,0 до 3,0 (від 20% до 25% хлорофілу b).

Фаза III. При надекспресії ХлаО співвідношення Хл a/b знижується до 2,7 (вміст хлорофілу b 27%).

Фаза IV. У трансгенних рослинах, які переважно експресують білок ХлаО без регуляторного домена, співвідношення Хл a/b зменшується з 2,7 до 0,8 (вміст хлорофілу b від 27 до 56%).

Фаза V. При схрещуванні цих рослин з мутантами, які не мають хлорофіл b редуктази (мутант *nuc1/nol*), співвідношення Хл a/b знижується до $< 0,8$ (вміст Хл b 56%).

Виявлено багато Хл-дефіцитних мутантів типу 2 (у яких вміст Хл знижений), і в усіх випадках показано, що дефіцит Хл b зумовлений частковим блокуванням синтезу Хл. У більшості з них блокування відбувається на одному і тому ж етапі біосинтезу, саме на утворенні протопорфірину IX – точці відгалуження між синтезом Хл та гема (рис. 4). З урахуванням цього, а також результатів інших досліджень (Ghirardi et al., 1986) було постульовано, що Хл b синтезується у значних кількостях тільки тоді, коли є "залишки" Хл a . Це може відбуватися після того як Хл a - зв'язуючі сайти в РЦ вже заповнені, і вільний Хл a не може зв'язатися з білками. Таким чином, часткове блокування основного шляху синтезу Хл опосередковано впливає на біосинтез Хл b . Виходячи з цього, було висунуто припущення (Ghirardi et al., 1986), що будь-який частковий блок у синтезі Хл спричиняє непряме та посилене інгібування синтезу Хл b , оскільки Хл b виробляється із залишків молекул Хл a . Цим пояснюється також плейотропна

природа структурних та біохімічних фенотипів Хл b -дефіцитних мутантів. Оскільки Хл b необхідний для стабілізації СЗК, але не РЦ, посилене інгібування синтезу Хл b призводить до зменшення розмірів фотосинтетичних одиниць та розвитку аномальних тилакоїдних мембран. Іншими словами, швидкість накопичення Хл у тилакоїдах визначає швидкість, з якою накопичуються як Хл b , так і різні типи Хл-зв'язуючих білків, а також рівновагу комплексів РЦ і СЗК у зрілих тилакоїдах.

Практично всі досліджені на сьогодні мутанти і трансгенні форми вищих рослин з порушеннями біосинтезу Хл b відрізняються зниженням фотосинтезу та продуктивності внаслідок істотних дефектів макроорганізації фотосинтетичного апарату. Тому на увагу заслуговує унікальний фенотип позбавленого Хл b мутанту ячменю *chlorina 3613* (Тютерева, Войцеховская, 2011; Тютерева и др., 2017), який демонструє високий рівень фотосинтезу та продуктивності, порівняний із таким у дикого

типу. Показано, що мутанти *chlorina* 3613 пристосовані до зниженого освітлення, незважаючи на відсутність більшої частини периферичної антени.

При вивченні регуляції онтогенезу особливий інтерес становлять мутанти з функціональним фенотипом *stay-green*, наприклад мутанти за генами автофагії. Як відомо, автофагія відіграє важливу роль в утилізації хлоропластних білків, у першу чергу рубіско, особливо при старінні. Функціональний *stay-green* фенотип з'являється у рослин внаслідок накопичення Хл *b* вище від норми. У трансгенних рослин *Arabidopsis* надекспресія гена ХлаО з ціанобактерії *Prochlorothrix hollandica* приводила до надпродукції Хл *b* (рис. 5), оскільки, на відміну від ендogenous ензиму рослин, цей ензим у рослинній клітині не піддається регуляції за принципом зворотного зв'язку. Вміст Хл *b* у таких рослин був настільки значиним, що він заміщав Хл *a* в антені ФС I і ФС II, а розмір світлозбиральної антени і її стабільність виявилися надзвичайно високими (Hirashima et al., 2006; Sakuraba et al., 2012). У цих рослин Хл *b* вбудовувався не тільки в світлозбиральні антенні комплекси, але і в ядро фотосистем (Hirashima et al., 2006). Заміщення 40% Хл *a* на Хл *b* у фотосистемах таких рослин не призводило до зниження їх фотосинтетичної активності порівняно з такою у дикого типу (Hirashima et al., 2006). Зворотний процес, тобто здатність Хл *a* структурно і функціонально заміщати Хл *b*, дотепер не показаний. Таким чином, припущення про функціональну взаємозамінність обох хлорофілів не підтверджується.

Трансформанти з надекспресією ХлаО демонстрували функціональний фенотип *stay-green* і відрізнялися від рослин дикого типу відтермінованим настанням старіння листків як при нестачі світла, так і в темряві (Hirashima et al., 2006; Sakuraba et al., 2012). Можливо, надстабілізація Хл *b* світлозбиральних пігмент-білкових комплексів і пролонгація їх активного функціонування змінюють кількість поки не ідентифікованих сигнальних молекул, необхідних для переключення онтогенетичних програм, що призводить до модулювання експресії геному, в тому числі зниження експресії SAG-генів (Тютерева и др., 2017). Роль таких сигнальних молекул могли б виконувати катаболіти Хл, апопротеїни СЗК II, позбавлені Хл *b*, або продукти їх протеолізу. Можна також припустити, що тривала підтримка антени СЗК II у функціональному стані підсилює фотозахист і, отже, забезпечує зниження вмісту АФК до мо-

менту початку старіння клітини. Ймовірно, це уповільнює ініціацію наступних стадій процесу старіння. У «косметичних» *stay-green* мутантів пігмент-білковий комплекс СЗК II зберігається, але втрачає здатність взаємодіяти з ФС II. Таким чином, цілком можливо, що причиною негативної зворотної регуляції ензиму ХлаО був вплив надлишкових кількостей Хл *b* на онтогенетичний сигналінг, опосередкований надстабілізацією антени СЗК II.

Припускають (Tanaka, Tanaka, 2011), що існує поріг вмісту хлорофілу *b*, який включається до сайтів зв'язування Хл *b* в СЗК (рис. 5). Якщо вміст Хл *b* перевищує цей пороговий рівень, Хл *b* буде ектопічно зв'язуватися з антенним комплексом ядра ФСII або з центрами СЗК, які в нормі зв'язують Хл *a*.

Вміст хлорофілів у рослин в умовах стресу

Розкриття механізмів, які залучені до синтезу хлорофілів і регуляції хлорофільного циклу, дозволяє наблизитися до розуміння причин впливу різноманітних стресових чинників на пігментний апарат рослин. На сьогодні можливо лише констатувати, що нестача чи надлишок води, низькі і високі температури, засоленість, важкі метали (ВМ), УФ-випромінювання, нестача мінеральних елементів і т. п. негативно позначаються на вмісті пігментів (Nouri et al., 2015). Однак сукупність біохімічних і фізіологічних процесів, які за умов стресів призводять до пригнічення синтезу або активації деструкції пігментів, поки що не визначена навіть схематично. Частковим винятком можна вважати ефекти ВМ, які вважаються небезпечним стресовим чинником. Вплив ВМ із часом посилюється через зростання їх надходження у навколишнє середовище з електростанцій, систем опалення, металургійних підприємств, через мінеральні добрива і відходи деяких виробництв (Орлов и др., 2002). У більшості випадків високі концентрації ВМ пригнічують ріст рослин, зменшують вміст Хл і знижують співвідношення Хл *a/b*, хоча і не завжди (Топчій, 2010; Meitei et al., 2014). У деяких випадках ВМ здатні включатися в хлорофільний макроцикл замість Mg^{2+} . Mg може бути заміщений на Cu, Zn, Cd, Pb, Hg, Ni (Watanabe, Kobayashi, 1988; Küpper et al., 2006). В природі окрім Mg-вмісних Хл зустрічаються лише Zn-вмісні бактеріохлорофіли у аеробних фотосинтезуючих бактерій роду *Acidiphilium* (Wakao et al., 1996; Hiraishi, Shimada, 2001). В умовах дуже низького рН (~1,5) Mg^{2+} може дуже легко заміщуватись на протони, при цьому бактеріохлорофіл конвер-

тується у бактеріофеофітин, а молекула [Zn]-бактеріохлорофілу значно стабільніша в кислому середовищі. При заміщенні Mg^{2+} на ВМ Хл з ряду причин є непридатним для фотосинтетичного перетворення. Акумуляція певної частки [ВМ]-Хл в антенних комплексах призводить до зниження ефективності або навіть до унеможливлення міграції енергії, оскільки ці похідні Хл стають центрами гасіння електронного збудження в антені.

Включення ВМ у тетрапірольне кільце Хл суттєво змінює їх спектральні властивості порівняно з Mg^{2+} -хлорофілами, що впливає на оцінку вмісту і особливо співвідношення пігментів при стандартному спектрофотометричному їх визначенні. Оскільки для переважної більшості [ВМ]-Хл спостерігається блакитне зрушення Q_y -смуги, то стандартне спектрофотометричне визначення вмісту пігментів може давати знижені значення співвідношення Хл a/b (Kürper et al., 2007).

Таким чином, дані свідчать, що у більшості рослин вміст Хл b , а також співвідношення Хл a/b варіює у досить широкому діапазоні умов (Хл $a/b = 2-5$). При цьому теоретично можливим нижнім порогом цього показника є 1,91 (табл. 2). Разом з цим, у літературі часто зустрічаються роботи, у яких наводяться величини, нижчі від цього співвідношення. Причиною таких помилок, ймовірно, є недотримання основних правил визначення пігментів у рослинному матеріалі, У зв'язку з цим заключна частина огляду присвячена методам визначення вмісту Хл і застереженням щодо типових помилок.

Визначення пігментів

Спектрофотометричне визначення хлорофілів ґрунтується на застосуванні закону Бугера-Ламберта-Бера:

$$I = I_0 \exp[-\alpha(\lambda) \cdot c \cdot l],$$

де I_0 – інтенсивність падаючого паралельного пучка випромінювання, I – інтенсивність випромінювання після проходження поглинаючого розчину, $\alpha(\lambda)$ – коефіцієнт поглинання, c – концентрація поглинаючих молекул, l – довжина шляху проходження променя. Коефіцієнт поглинання сталий на всьому шляху проходження променя, але залежить від довжини хвилі випромінювання і характеризує поглинаючу здатність молекул. Частіше, однак, закон Бугера-Ламберта-Бера подають в іншому вигляді:

$$A = \lg(I_0/I) = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot l.$$

Величину $\lg(I_0/I)$ раніше називали оптичною густиною і позначали як D (Density) або

OD (Optical density); останнім часом переважно використовують термін «поглинання» (A – Absorbance). Величина $\lg(I_0/I)$ вимірюється безпосередньо на спектрофотометрі. Коли концентрацію виражають в молях на літр, $\varepsilon(\lambda)$ називають молярним коефіцієнтом екстинкції (поглинання). Оптична густина – величина безрозмірна, отже розмірність ε – $[моль^{-1} \cdot см^{-1}]$. Коли концентрацію виражають в мкг/мл чи мг/мл, $\varepsilon(\lambda)$ називають питомим коефіцієнтом екстинкції з розмірностями $[мл \cdot мкг^{-1} \cdot см^{-1}]$ або $[мл \cdot мг^{-1} \cdot см^{-1}]$. Оптична густина – величина адитивна, тобто при наявності кількох поглинаючих агентів оптична густина розчину на даній довжині хвилі є сумою її складників:

$$A = A_1 + A_2 + \dots + A_n = (\varepsilon_1 \cdot c_1 + \varepsilon_2 \cdot c_2 + \dots + \varepsilon_n \cdot c_n) \cdot l.$$

Розрахунок концентрації хлорофілів в екстракті з фотосинтезуючої тканини проводять, вимірюючи оптичну густина для двох довжин хвиль у максимумі поглинання пігментів в червоній області спектра (Q_y смуги хлорофілів) (рис. 3). Такий розрахунок називають двоххвильовим методом. Відповідні рівняння записують як:

$$A_1 = (\varepsilon_{a1} \cdot C_a + \varepsilon_{b1} \cdot C_b)$$

$$A_2 = (\varepsilon_{a2} \cdot C_a + \varepsilon_{b2} \cdot C_b),$$

де A_1 і A_2 – оптична густина розчину на довжинах хвиль у максимумі поглинання Хл a і Хл b , відповідно, ε_{a1} , ε_{a2} , ε_{b1} , ε_{b2} , – коефіцієнти екстинкції Хл a і Хл b на відповідних довжинах хвиль. Розв'язавши систему рівнянь відносно C_a і C_b , отримуємо:

$$C_a = (A_1 \cdot \varepsilon_{b2} - A_2 \cdot \varepsilon_{b1}) / (\varepsilon_{a1} \cdot \varepsilon_{b2} - \varepsilon_{a2} \cdot \varepsilon_{b1})$$

$$C_b = (A_2 \cdot \varepsilon_{a1} - A_1 \cdot \varepsilon_{a2}) / (\varepsilon_{a1} \cdot \varepsilon_{b2} - \varepsilon_{a2} \cdot \varepsilon_{b1}).$$

Наприклад, концентрації пігментів у 80%-му ацетоні розраховують за формулами (Lichtenthaler, Buschmann, 2001):

$$\text{Хл } a \text{ (мкг/мл)} = 12,25 \cdot A_{663,2} - 2,79 \cdot A_{646,8}$$

$$\text{Хл } b \text{ (мкг/мл)} = 21,50 \cdot A_{646,8} - 5,10 \cdot A_{663,2}.$$

Процедура визначення коефіцієнтів поглинання описана у відповідних роботах (Porra et al., 1989; Porra, 2002; Ritchie, 2006). Основні застереження стосовно власне рівнянь виникають тільки з приводу визначення коефіцієнтів поглинання хлорофілів. Для цього потрібні чисті пігменти, незалежно точно визначення їх концентрації, наприклад, через концентрацію іонів магнію, і якісний спектрофотометричний аналіз.

При масових рутинних аналізах вмісту хлорофілів недотримання певних правил здатне істотно вплинути на результати та змінити величину їх співвідношення.

ВАРІАЦІЯ СПІВВІДНОШЕННЯ ВМІСТУ ХЛОРОФІЛІВ *a* І *b*

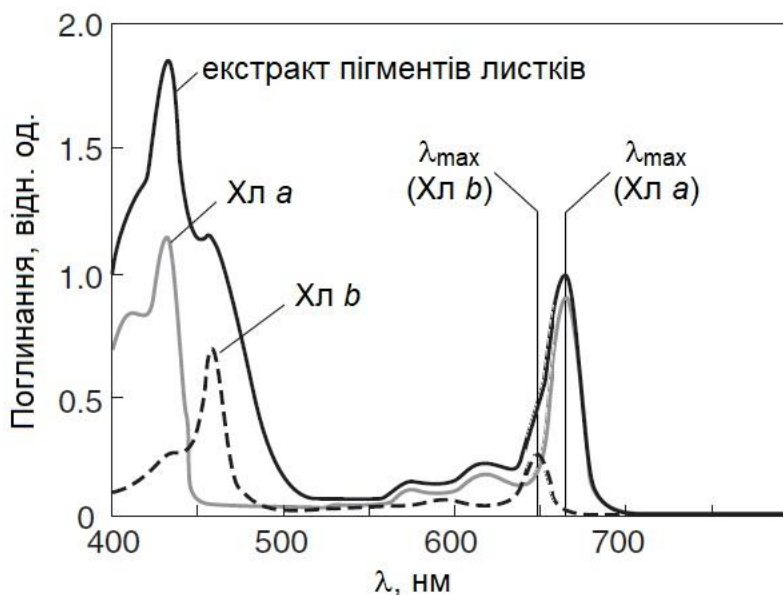


Рис. 6. Спектри поглинання хлорофілів, екстрагованих із зелених листків тютюну (*Nicotiana tabacum* L.) 100% ацетоном (Використано дані: Lichtenthaler, Buschmann, 2001).

Застереження, пов'язані з підготовкою екстрактів пігментів. Для визначення вмісту пігментів спочатку потрібно екстрагувати їх з рослинних тканин. Першою вимогою до екстракції є її повнота. Як екстрагенти використовують ацетон, суміші ацетон:вода (9:1 або 8:2), етанол, метанол, хлороформ, диметилсульфоксид (ДМСО), диметилформамід (ДМФА). Найчастіше для екстракції Хл застосовують ацетон через його відносно низьку токсичність і високу ефективність як екстрагента, хоча й відзначалося, що одноразова екстракція водним ацетоном не повністю вилучає пігменти (головним чином β -каротин) з листків (Thayer, Vjörkman, 1992; Dunn et al., 2004). Однак повторення процедури знімає це застереження. Хоча частина пігментів з клітин вилучається вже при простому замочуванні в розчиннику, для покращення екстрагування найчастіше рослинний матеріал розтирають або піддають обробці ультразвуком. При застосуванні ДМСО чи ДМФА рослинний матеріал можна не дезінтегрувати. З міркувань безпеки перевагу бажано віддавати малотоксичним і важкозаймистим екстрагентам.

Оскільки в основі визначення вмісту пігментів лежить спектрофотометричний аналіз екстрактів рослинних тканин, то будь-які маніпуляції в процесі їх отримання, які призводять до утворення похідних сполук зі спектрами поглинання, відмінними від спектрів нативних пігментів, можуть змінити результат. Під час процедури екстракції пігментів мають бути мінімізовані перетворення і деградація пігментів.

Для цього процедура має відбуватися якомога швидше, з мінімальною кількістю етапів, за нейтрального рН, при слабкому розсіяному світлі і низькій температурі. Клітинний сік зазвичай має кислу реакцію, тому рекомендують при розтиранні листків додавати до екстрагента невелику кількість NH_4OH , MgCO_3 , або CaCO_3 (крейду) для запобігання феофітинізації пігментів.

Як і для будь-якого аналітичного методу, невід'ємною умовою адекватної процедури визначення пігментів є її відтворюваність з високою точністю.

Застереження при проведенні спектрофотометрії пігментів. Деякі зразки можуть бути каламутними і розсіювати світло, тому потрібно позбуватися каламуті центрифугуванням або фільтруванням розчинів. Однак, коли це не вдається зробити повністю, оптичну густину зразків потрібно скорегувати. Для корекції оптичної густини, тобто врахування неспецифічного розсіювання, від показників при відповідних довжинах хвиль віднімають оптичну густину зразка при 750 нм. Після 700 нм «видиме поглинання» зумовлене каламутністю розчину, тобто розсіюванням. Оскільки оптична густина екстракту пігментів в області поглинання Хл *b* значно нижча ніж Хл *a* (рис. 6), то для каламутних розчинів відносна похибка у визначенні Хл *b* буде вищою, ніж Хл *a*.

При проведенні аналізу слід також використовувати мінімальну ширину щілини спектрофотометра та ретельно встановлювати довжину хвилі, оскільки визначення оптичної гус-

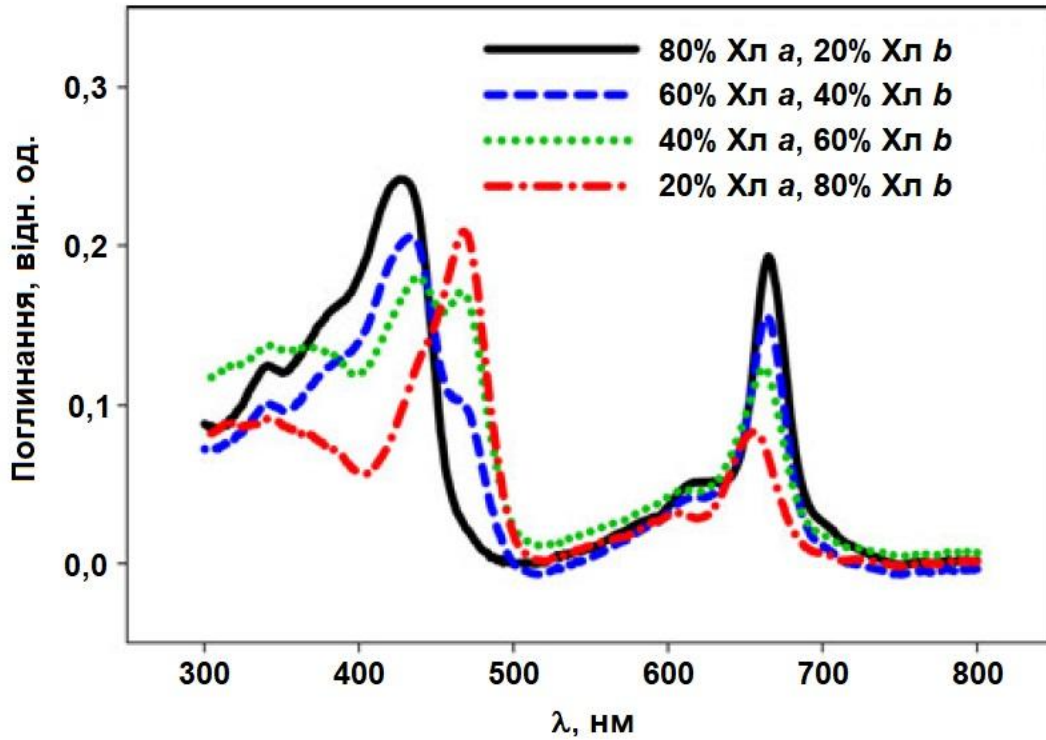


Рис. 7. Спектри поглинання зразків хлорофілу з *Liriodendron tulipifera* при варіюванні концентрацій хлорофілу *a* і хлорофілу *b*. Загальна концентрація хлорофілів однакова в усіх зразках (2 мкМ) (Використано дані: Lamb et al., 2012).

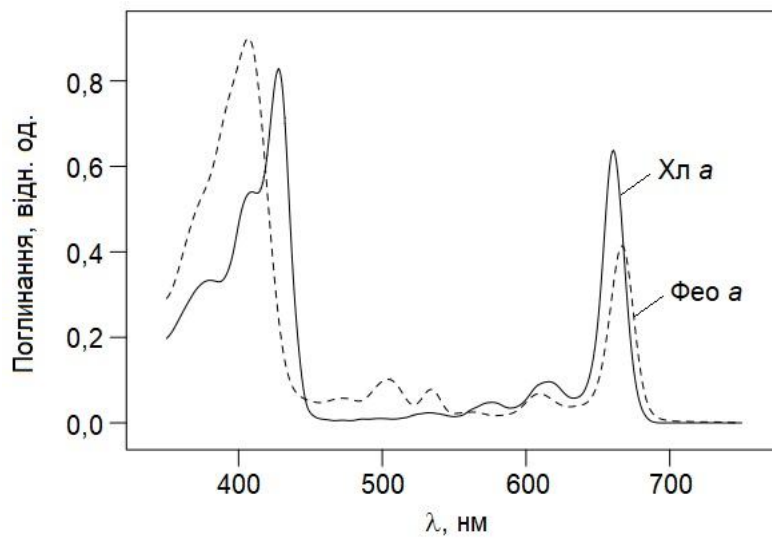


Рис. 8. Спектри поглинання хлорофілу *a* і феофітину *a*.

тини Хл *b*, зокрема, проводять не в максимумі спектра поглинання екстракту пігментів. У сумарному спектрі поглинання хлорофілів у червоній області поглинання Хл *b* при низьких його концентраціях проявляється як розширення, з короткохвильового боку, практично гаусової Q_y смуги Хл *a*. На рис. 7 показано, як впливає збільшення частки Хл *b* у сумарному екстракті Хл на спектр його поглинання. Видно, що при збільшенні відносного вмісту Хл *b* його погли-

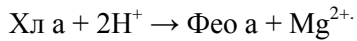
нання починає проявлятися все виразніше, переходячи в плече смуги поглинання Хл *a*, і відбувається зрушення максимуму сумарного спектра в короткохвильову область. Наведені спектри наочно свідчать, що неможливо отримати достовірні результати вмісту Хл при вимірюванні поглинання у смугі Соре.

Можливість модифікації функціональних груп Хл забезпечує появу цілого ряду їх дериватів. На увагу заслуговують ті з них, які мо-

ВАРІАЦІЯ СПІВВІДНОШЕННЯ ВМІСТУ ХЛОРОФІЛІВ a І b

жуть достатньо легко утворюватися в процесі підготовки зразків рослинного матеріалу і впливати на спектрофотометричне визначення концентрацій Хл a і Хл b .

Вплив протонів. Феофітинізація. У кислому середовищі центральний іон магнію Хл легко заміщується протонами з утворенням феофітину:



Заміна магнію на протони приводить до зміни спектра поглинання пігменту. Відбувається значне зниження молярного коефіцієнта екстинкції червоної Q_y смуги і невелике зрушення у довгохвильову область (рис. 8). Оскільки Хл a значно швидше конвертується у феофітин a (Фео a) ніж Хл b , спостерігається уявне зменшення співвідношення Хл a/b . Навіть при рН 6 через 30 годин близько 10% Хл a перетворюється на Фео a (Mazaki et al., 1992). Як вже відзначалося раніше, феофітинізацію хлорофілів при виділенні відвертають додаванням до екстрагенту карбонатів лужноземельних металів або гідроксиду амонію.

Дія лугу на хлорофіл. Хлорофіл можна вважати естером дикарбонової кислоти хлорофіліну, естерифікованої метанолом і фітолом, тому що він має 2 естерні групи при C_{132} та C_{172} . При взаємодії складних ефірів з лугами відбувається розрив складноєфірних зв'язків з утворенням солі даної кислоти (К/Na-хлорофілін) і двох названих спиртів (реакція омилення). Відщеплення залишку фітолу і утворення водорозчинного хлорофіліду не впливає на спектр поглинання, принаймні у видимій області, а впливає тільки на переходи в ультрафіолетовій області.

Луги каталізують також енолізацію в циклопентаноновому кільці (Hunnien, Ellfok, 1973). У полярних розчинниках енол іонізується з утворенням енолят-аніона, який має спектр, істотно відмінний від спектра Хл. Енолят-аніон нестабільний, швидко атакується киснем з утворенням різних продуктів залежно від розчинника. Етерні розчини нативного хлорофілу при додаванні спиртового лугу в присутності кисню дають так звану буру фазу Моліша, колір якої швидко знову стає зеленим, що пов'язують з розивом циклопентанонового кільця і переходом від форбіну до хлорину, Mg хлорину еб.

У спиртових розчинах пігментів при контакті з повітрям відбувається реакція аломеризації, яка включає окиснення $C-13^2$ триплетним киснем (3O_2). Продукти окиснення (аломери) мають атом кисню замість гідрогену, зв'язаного з карбоном $C-13^2$.

Утворюється, наприклад, гідроксихлорофіл (Хл- $C13^2-OH$). У подальшому, особливо в присутності лугу, розрив циклопентанонового кільця з утворенням Mg хлорину еб, тобто перехід від форбіну до хлорину, що приводить до зміни спектрів поглинання, зрушення червоної смуги в короткохвильовий бік (Seely, 1966). Mg хлорин еб називають ще хлорофіліном (Seely, 1966).

Фотодеградація. Визначення вмісту пігментів і співвідношення Хл a/b значною мірою залежить від опромінення екстракту. Світло, особливо інтенсивне, за наявності кисню, спричиняє «вицвітання» розчинів хлорофілів. При цьому фотодеструкція Хл a відбувається з більш високою швидкістю, ніж Хл b . Показано, зокрема, для розчинів пігментів в етанолі, що час напіврозкладу ($\tau_{1/2}$) Хл a складає 110 хв, а Хл b – 240 хв при опроміненні їх червоним світлом $31,2 \text{ мВт/см}^2$ ($\lambda \geq 630 \text{ нм}$) (Karcz et al., 2014). Переважаюча фотодеструкція Хл a порівняно з Хл b під дією світла відзначалася також для ізольованих тилакоїдних мембран (Veltchkova, Picorel, 2004). Оскільки опромінення добре вакуумованих розчинів хлорофілів не викликає деструкції пігментів (Дилунг, Карпитская, 1963), у присутності кисню фотодеградація пігментів зумовлена його активними формами. Механізми фотодеградації хлорофілів та причина меншої ефективності процесу у випадку Хл b ще потребують вивчення (Okazaki et al., 2010).

Дія хлорофілази. При руйнуванні тканин листка може відбуватися дефітилізація Хл з утворенням водорозчинного хлорофіліду a , каталізована хлорофілазою (Сиваш, Золотарева, 2013; Syvash, Zolotareva, 2017). Оскільки субстратом хлорофілазної реакції є лише Хл a , при визначенні вмісту пігментів співвідношення Хл a/b у мембранних препаратах хлоропластів можуть бути отримані занижені значення. Активністю хлорофілази можуть бути зумовлені й помилки при визначенні співвідношення Хл a/b у пошкоджених листках.

Таким чином, у процесі екстракції пігментів (з фотосинтезуючих тканин), через чутливість хлорофілів до різного роду хімічних перетворень та світла, можливе утворення цілого ряду похідних структур. Ці трансформації включають феофітинізацію, кето-енольну таутомерию, окиснення (аломеридацію), фотовицвітання. Якщо при масових аналізах отримують низькі значення (Хл $a/b < 2$), то найперше потрібно проаналізувати процедуру визначення концентрації пігментів на предмет утворення

похідних хлорофілів. Тобто низькі значення співвідношення пігментів (Хл $a/b < 2$), є чи не найпростішим індикатором, можливих трансформацій пігментів, особливо у випадках рослин, що не зазнали стресових впливів.

ЛІТЕРАТУРА

- Дилунг И.И., Карпитская В.Е. 1963. Фотохимическое окисление хлорофилла а в замороженных растворах. ДАН СССР. 152 : 367-369. (Dilung I.I., Karpitskaya V.E. 1963. Chlorophyll a photochemical oxidation in frozen solutions. DAN USSR. 152 : 367-369.)
- Орлов Д.С., Садовникова Л.К., Лозановская И.Н. 2002. Экология и охрана биосферы при химическом загрязнении. Москва : 334 с. (Orlov D.S., Sadovnikova L.K., Lozanovskaya I.N. 2002. Ecology and biosphere protection under chemical pollution. (Ekologiya i okhrana biosfery pri khimicheskom zagryaznenii). Moscow : 334 p.)
- Сиваш А.А., Золотарева Е.К. 2013. Катаболизм хлорофилла в растениях. Вісн. Харк. нац. аграр. ун-ту Сер. Біологія. 3 (30) : 6-17. (Syvash O.O., Zolotareva E.K. 2013. Chlorophyll catabolism in plants. Bull. Kharkiv. Natl. Agrar. Univ. Ser. Biology. (Visnyk Kharkiv. Natsional. Agrarn. Univer. Ser. Biologiya). 3 (30) : 6-17.)
- Сиваш А.А., Фомишина Р.Н., Захарова Т.О., Золотарева Е.К. 2016. Хлорофиллазная активность и пигментный состав листьев растений разных ярусов широколиственного леса. Вісн. Харк. нац. аграр. ун-ту Сер. Біологія. 2 (38) : 75-83. (Syvash O.O., Fomishyna R.N., Zakharova T.O., Zolotareva E.K. 2016. Chlorophyllase activity and pigment composition in leaves of forest plants of different layers of broad-leaved forest. Bull. Kharkiv. Natl. Agrar. Univ. Ser. Biology. (Visnyk Kharkiv. Natsional. Agrarn. Univer. Ser. Biologiya). 2 (38) : 75-83.)
- Топчий Н.М. 2010. Вплив важких металів на фотосинтез. Физиология и биохимия культ. растений. 42 (2) : 95-106. (Topchiy N.M. Effect of heavy metals on photosynthesis. 2010. Fiziologiya i Biokhimiya Kult. Rastanii. 42 (2) : 95-106.)
- Тютерева Е.В., Войцеховская О.В. 2011. Реакции лишеного хлорофилла *b* мутанта ячменя *chlorina* 3613 на пролонгированное снижение освещенности. 1. Динамика содержания хлорофиллов, рост и продуктивность. Физиология растений. 58 (1) : 3-11. (Tyutereva E.V., Voitsekhovskaja O.V. 2011. Responses of chlorophyll *b*-Free *chlorina* 3613 barley mutant to a prolonged decrease in illuminance: 1. Dynamics of chlorophyll content, growth, and productivity. Russ. J. Plant Physiol. (Fiziologiya Rastanii). 58 (1) : 1-8.)
- Тютерева Е.В., Дмитриева В.А., Войцеховская О.В. 2017. Хлорофилл *b* как источник сигналов, регулирующих развитие и продуктивность растений. С.х. биология. 52 : 843-855. (Tyutereva E.V., Dmitrieva V.A., Voitsekhovskaja O.V. 2017. Chlorophyll *b* as a source of signals steering plant development. Selskokhozyajstvennaya Biologiya. 52 : 843-855.)
- Фомішина Р.М., Сиваш О.О., Захарова Т.О., Золотарева О.К. 2009. Роль хлорофілази в адаптації рослин до умов освітлення. Укр. ботан. журн. 66 : 94-102. (Fomishyna R.N., Syvash O.O., Zakharova T.O., Zolotar'ova O.K. 2009. The role of chlorophyllase in adaptation of plants to light regimes. Ukrainskii Botanicheskii Zhurnal. 66 : 94-102.)
- Albertsson P.A. 2001. A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane. Trends Plant Sci. 6 : 349-354.
- Albertsson P.A., Andreasson E. 2004. The constant proportion of grana and stroma lamellae in plant chloroplasts. Physiol. Plant. 121 : 334-342.
- Allen J.F. 1992. Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta. 1098 : 275-335.
- Allen J., Forsberg J. 2001. Molecular recognition in thylakoid structure and function. Trends Plant Sci. 6 : 317-326.
- Allen K.D., Duysen M.E., Staehelin L.A. 1988. Biogenesis of thylakoid membranes is controlled by light intensity in the conditional chlorophyll *b*-deficient CD3 mutant of wheat. J. Cell Biol. 107 : 907-919.
- Anderson J.M. 1980. Chlorophyll—protein complexes of higher plant thylakoids: distribution, stoichiometry and organization in the photosynthetic unit. FEBS Lett. 117 : 327-331.
- Anderson J.M. 1986. Photoregulation of the composition, function, and structure of thylakoid membranes. Annu. Rev. Plant Physiol. 37 : 93-136.
- Anderson J.M., Levine R.P. 1974. Membrane polypeptides of some higher plant chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta. 333 : 378-387.
- Aro E.-M., Suorsa M., Rokka A., Allahverdiyeva Y., Paakkarinen V., Saleem A., Battchikova N., Rintamäki E. 2004. Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. J. Exp. Bot. 56 : 347-356.
- Bailey S., Walters R.G., Jansson S., Horton P. 2001. Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses. Planta. 213 : 794-801.
- Ballottari M., Govoni C., Caffarri S., Morosinotto T. 2004. Stoichiometry of LHCI antenna polypeptides and characterization of gap and linker pigments in higher plants photosystem I. Eur. J. Biochem. 271 : 4659-4665.
- Ballottari M., Dall'Osto L., Morosinotto T., Bassi R. 2007. Contrasting behavior of higher plant

ВАРІАЦІЯ СПІВВІДНОШЕННЯ ВМІСТУ ХЛОРОФІЛІВ *a* І *b*

- photosystem I and II antenna systems during acclimation. *J. Biol. Chem.* 282 : 8947-8958.
- Barber J. 1980. Membrane surface charges and potentials in relation to photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 594 : 253-308.
- Bellemare G., Bartlett S.G., Chua N.H. 1982. Biosynthesis of chlorophyll *a/b*-binding polypeptides in wild type and the *chlorina f2* mutant of barley. *J. Biol. Chem.* 257 : 7762-7767.
- Betterle N., Ballottari M., Zorzan S., de Bianchi S., Cazzaniga S., Dall'osto L., Morosinotto T., Bassi R. 2009. Light-induced dissociation of an antenna hetero-oligomer is needed for nonphotochemical quenching induction. *J. Biol. Chem.* 284 : 15255-15266.
- Boekema E.J., van Roon H., Calkoen F., Bassi R., Dekker J.P. 1999. Multiple types of association of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *Biochemistry.* 38 : 2233-2239.
- Bogorad L. 1976. Chlorophyll biosynthesis. In : *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments.* Academic Press, London : 64-148.
- Bonente G., Pippa S., Castellano S., Bassi R., Ballottari M. 2012. Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to different growth irradiances. *J. Biol. Chem.* 287 : 5833-5847.
- Caffarri S., Kouřil R., Kerešiče S., Boekema E., Croce R. 2009. Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes. *EMBO J.* 28 : 3052-3063.
- Castelletti S., Morosinotto T., Robert B., Caffarri S., Bassi R., Croce R. 2003. Recombinant Lhca2 and Lhca3 subunits of the photosystem I antenna system. *Biochemistry.* 42 : 4226-4234.
- Chow W.S., Melis A., Anderson J.M. 1990. Adjustments of photosystem stoichiometry in chloroplasts improve the quantum efficiency of photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 7 : 7502-7506.
- Croce R., van Amerongen H. 2011. Light-harvesting and structural organization of Photosystem II: from individual complexes to thylakoid membrane. *J. Photochem. Photobiol. B.* 104 : 142-153.
- Daum B., Nicastro D., Austin J.II, McIntosh J.R., Kuhlbrandt W. 2010. Arrangement of photosystem II and ATP synthase in chloroplast membranes of spinach and pea. *Plant Cell.* 22 : 1299-1312.
- Dekker J.P., Boekema E.J. 2005. Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim. Biophys. Acta.* 1706 : 12-39.
- Dittami S.M., Michell G., Collén J., Boyen C., Tonon T. 2010. Chlorophyll-binding proteins revisited – a multigenic family of light-harvesting and stress proteins from a brown algal perspective *BMC Evolutionary. Biol.* 10 : 365-379.
- Duffy C., Valkunas L., Ruban A. 2013. Light-harvesting processes in the dynamic photosynthetic antenna. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 : 18752-18771.
- Dunn J.L., Turnbull J.D., Robinson S.A. 2004. Comparison of solvent regimes for the extraction of photosynthetic pigments from leaves of higher plants. *Funct. Plant Biol.* 31 : 195-202.
- Dymova O., Fiedor L. 2014. Chlorophylls and their role in photosynthesis. In: *Photosynthetic Pigments: Chemical Structure, Biological Function and Ecology.* Syktyvkar : 140-160.
- Espineda C., Linford A., Devine D., Brusslan J. 1999. The AtCAO gene, encoding chlorophyll *a* oxygenase, is required for chlorophyll *b* synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96 : 10507-10511.
- Fan D.Y., Hope A.B., Smith P.J., Jia H., Pace R.J., Anderson J.M., Chow W.S. 2007. The stoichiometry of the two photosystems in higher plants revisited. *Biochim. Biophys. Acta.* 1767 : 1064-1072.
- Funk C., Adamska I., Green B.R., Andersson B., Renger G. 1995. The nuclear-encoded chlorophyll-binding photosystem II-S protein is stable in the absence of pigments. *J. Biol. Chem.* 270 : 30141-30147.
- Galka P., Santabarbara S., Khuong T.T.H., Degand H., Morsomme P., Jennings R.C., Boekema E.J., Caffarri S. 2012. Functional analyses of the plant photosystem I-light-harvesting complex II supercomplex reveal that light-harvesting complex II loosely bound to photosystem II is a very efficient antenna for photosystem I in state II. *Plant Cell.* 24 : 2963-2978.
- Ganeteg U., Klimmek F., Jansson S. 2004. Lhca5- an LHC-type protein associated with photosystem I. *Plant Mol. Biol.* 54 : 641-651.
- Genge S., Pilger D., Hiller R.G. 1974. The relationship between chlorophyll *b* and pigment-protein complex II. *Biochim. Biophys. Acta.* 347 : 22-30.
- Ghirardi M.L., Melis A. 1983. Localization of photosynthetic electron transport components in mesophyll and bundle sheath chloroplasts of *Zea mays*. *Arch. Biochem. Biophys.* 224 : 19-28.
- Ghirardi M.L., McCauley S.W., Melis A. 1986. Photochemical apparatus organization in the thylakoid membrane of *Hordeum vulgare* wild type and chlorophyll *b*-less *chlorina f2* mutant. *Biochim. Biophys. Acta.* 851 : 331-339.
- Goodchild D.J., Bjorkman O., Pyliotis N.A. 1972. Chloroplast ultrastructure, leaf anatomy, and content of chlorophyll and soluble protein in rainforest species. *Carnegie Inst. Wash.* 71: 102-107.
- Harrison M. A., Nemson J. A., Melis A. 1993. Assembly and composition of the chlorophyll *a-b* light-harvesting complex of barley (*Hordeum vulgare* L.): Immunochemical analysis of chlorophyll *b*-less and chlorophyll *b*-deficient mutants. *Photosynth. Res.* 1993. 38 : 141-151.

- Hiraishi A., Shimada K. 2001. Aerobic anoxygenic bacteria with zinc-bacteriochlorophyll. *J Gen. Appl. Microbiol.* 47 : 161-180.
- Hirashima M., Satoh S., Tanaka R., Tanaka A. 2006. Pigment shuffling in antenna systems achieved by expressing prokaryotic chlorophyllide a oxygenase in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 281 : 15385-15393.
- Hopkins M., Taylor C., Liu Z., Ma F., McNamara L., Wang T., Thompson J.E. 2007. Regulation and execution of molecular disassembly and catabolism during senescence. *New Phytol.* 175 : 201-214.
- Horie Y., Ito H., Kusaba M., Tanaka R., Tanaka A. 2009. Participation of chlorophyll b reductase in the initial step of the degradation of light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complexes in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 284 : 17449-17456.
- Hynnien P.H., Ellfok N. 1973. Chlorophylls I. Separation and isolation Chlorophylls a and b by multiple liquid-liquid partition. *Acta Chem. Scand.* 27 : 1463-1477.
- Ito H., Tanaka A. 1996. Determination of the activity of chlorophyll b to chlorophyll a conversion during greening of etiolated cucumber cotyledons by using pyrochlorophyllide b. *Plant Physiol. Biochem.* 34: 35-40.
- Jackowski G., Kacprzak K., Jansson S. 2001. Identification of Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3 Heterotrimers of the main light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex of photosystem II (LHC II). *Biochim. Biophys. Acta.* 1504 : 340-345.
- Jansson S. 1999. A guide to the Lhc genes and their relatives in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 4 : 236-240.
- Jenkins C.L.D., Boag S. 1985. Isolation of bundle sheath cell chloroplasts from the NADP-ME type C₄ plant *Zea mays*. *Plant Physiol.* 79 : 84-89.
- Karcz D., Boroń B., Matwijczuk A., Furso J., Staroń J., Ratuszna A., Fiedor L. 2014. Lessons from chlorophylls: modifications of porphyrinoids towards optimized solar energy conversion. *Molecules.* 19 : 15938-15954.
- Kim J.H., Glick R.E., Melis A. 1993. Dynamics of photosystem stoichiometry adjustment by light quality in chloroplasts. *Plant Physiol.* 102 : 181-190.
- Kirchhoff H. 2008. Molecular crowding and order in photosynthetic membranes. *Trends Plant Sci.* 13 : 201-207.
- Kouřil R., Zygadlo A., Arteni A.A., de Wit C.D., Dekker J.P., Jensen P.E., Scheller H.V., Boekema E.J. 2005. Structural characterization of a complex of photosystem I and light-harvesting complex II of *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry.* 44 : 10935-10940.
- Kouřil R., Dekker J.P., Boekema E.J. 2012. Supramolecular organization of photosystem II in green plants. *Biochim. Biophys. Acta.* 1817 : 2-12.
- Kouřil R., Wientjes E., Bultema J.B., Croce R., Boekema E.J. 2013. High-light vs. low-light: Effect of light acclimation on photosystem II composition and organization in *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1827 : 411-419.
- Krüger T.P., Iliaoa C., Johnson M.P., Belgio E., Horton P., Ruban A.V., van Grondelle R. 2013. The specificity of controlled protein disorder in the photoprotection of plants. *Biophys. J.* 105 : 1018-1026.
- Küpper H., Küpper F.C., Spiller M. 2006. [Heavy metal]-Chlorophylls formed in vivo during heavy metal stress and degradation products formed during digestion, extraction and storage of plant material. In: *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications.* Springer, Printed in The Netherlands : 67-77.
- Küpper H., Seibert S., Parameswaran A. 2007. Fast, sensitive, and inexpensive alternative to analytical pigment HPLC: Quantification of chlorophylls and carotenoids in crude extracts by fitting with gauss peak spectra. *Anal. Chem.* 79 : 7611-7627.
- Lamb J.J., Eaton-Rye J.J., Hohmann-Marriott M.F. 2012. An LED-based fluorometer for chlorophyll quantification in the laboratory and in the field. *Photosynth. Res.* 114 : 59-68.
- Lemeille S., Rochaix J.D. 2010. State transitions at the crossroad of thylakoid signalling pathways. *Photosynth. Res.* 106 : 33-46.
- Lichtenthaler H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth. Enzymol.* 148 : 350-382.
- Lichtenthaler H.K., Buschmann C. 2001. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry.* John Wiley & Sons, Inc. : F4.3.1-F4.3.8.
- Liu Z., Yan H., Wang K., Kuang T., Zhang J., Gui L., An X., Chang W. 2004. Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature.* 428: 287-292.
- Mamedov M., Govindjee, Nadtochenko V., Semenov A. 2015. Primary electron transfer processes in photosynthetic reaction centers from oxygenic organisms. *Photosynth. Res.* 125 : 51-63.
- Mazaki H., Watanabe T., Takahashi T., Struck A., Scheer H.H. 1992. Pheophytinization of eight chlorophyll derivatives in aqueous acetone. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 65 : 3212-3214.
- Mazor Y., Borovikova A., Caspy I., Nelson N. 2017. Structure of the plant photosystem I supercomplex at 2.6 Å resolution. *Nature Plant.* 3 : 17014.
- Meitei M.D., Kumar A., Prasad M.N.V., Matec P., Waloszek A., Maleva M., Strzalka K. 2014. Photosynthetic pigments and pigment-protein complexes of aquatic plants under heavy metal stress. In: *Photosynthetic Pigments: Chemical Structure, Biological Function and Ecology.* Syktyvkar : 317-332.

ВАРІАЦІЯ СПІВВІДНОШЕННЯ ВМІСТУ ХЛОРОФІЛІВ *a* І *b*

- Montané M.H., Kloppstech K. 2000. The family of light-harvesting-related proteins (LHCs, ELIPs, HLIPs): was the harvesting of light their primary function? *Gene*. 258 : 1-8.
- Morosinotto T., Bassi R., Frigerio S., Finazzi G., Morris E., Barber J. 2006. Biochemical and structural analyses of a higher plant photosystem II supercomplex of a photosystem I-less mutant of barley. Consequences of a chronic over-reduction of the plastoquinone pool. *FEBS J.* 273 : 4616-4630.
- Mullineaux C. 2005. Function and evolution of grana. *Trends Plant Sci.* 10 : 521-525.
- Murchie E.H., Horton P. 1997. Acclimation of photosynthesis to irradiance and spectral quality in British plant species: chlorophyll content, photosynthetic capacity, and habitat preference. *Plant Cell Environ.* 20 : 438-448.
- Nelson N. 2009. Plant photosystem I: the most efficient nanophotochemical machine. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9 : 1709-1713.
- Nield J., Orlova E.V., Morris E.P., Gowen B., van Heel M., Barber J. 2000. 3D map of the plant photosystem II supercomplex obtained by cryoelectron microscopy and single particle analysis. *Nat. Struct. Biol.* 7 : 44-47
- Nield J., Barber J. 2006. Refinement of the structural model for the Photosystem II supercomplex of higher plants. *Biochim. Biophys. Acta.* 1757 : 353-361.
- Niyogi K.K., Li X.P., Rosenberg V., Jung H.S. 2005. Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? *J. Exp. Bot.* 56 : 375-382.
- Nouri M.Z., Moumeni A., Komatsu S. 2015. Abiotic stresses: insight into gene regulation and protein expression in photosynthetic pathways of plants. *Int. J. Mol. Sci.* 16 : 20392-20416.
- Okazaki S., Tomo T., Mimuro M. 2010. Direct measurement of singlet oxygen produced by four chlorin-ringed chlorophyll species in acetone solution. *Chem. Phys. Lett.* 485 : 202-206.
- van Oort B., Alberts M., de Bianchi S., Dall'Osto L., Bassi R., Trinkunas G., van Amerongen H. 2010. Effect of antenna-depletion in photosystem II on excitation energy transfer in *Arabidopsis thaliana*. *Biophys. J.* 98 : 922-931.
- Oster U., Tanaka R., Tanaka A., Rüdiger W. 2000. Cloning and functional expression of the gene encoding the key enzyme for chlorophyll *b* biosynthesis (CAO) from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 21 : 305-310.
- Pan X., Liu Z., Li M., Chang W. 2013. Architecture and function of plant light-harvesting complexes II. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23 : 515-525.
- Passarini F., Xu P., Caffarri S., Hille J., Croce R. 2014. Towards *in vivo* mutation analysis: knock-out of specific chlorophylls bound to the light-harvesting complexes of *Arabidopsis thaliana* – the case of CP24 (Lhcb6). *Biochim. Biophys. Acta.* 1837 : 1500-1506.
- Peter G.F., Thornber J.P. 1991. Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment proteins. *J. Biol. Chem.* 266 : 16745-16754.
- Pfannschmidt T., Nilsson A., Allen J.F. 1999. Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature.* 397 : 625-628.
- Porra R.J. 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. *Photosynth. Res.* 73 : 149-156
- Porra R.J., Thompson W.A., Kreidemann P.E. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta.* 975 : 384-394.
- Qin X., Suga M., Kuang T., Shen J.-R. 2015. Structural basis for energy transfer pathways in the plant PSI-LHCI supercomplex. *Science.* 348 : 989-995.
- Reinbothe C., Bartsch S., Eggink L.L., Hooper J.K., Brusslan J., Andrade-Paz R., Monnet J., Reinbothe S. 2006. A role for chlorophyllide *a* oxygenase in the regulated import and stabilization of light-harvesting chlorophyll *a/b* proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103 : 4777-4782.
- Ritchie R.J. 2006. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynth. Res.* 89 : 27-41.
- Rosianskey Y., Dahan Y., Yadav S., Freiman Z. E., Milo-Cochavi S., Kerem Z., Eyal Y., Flaishman M.A. 2016. Chlorophyll metabolism in pollinated vs. parthenocarpic fig fruits throughout development and ripening. *Planta.* 244 (2) : 491-504.
- Ruban A. 2009. Plants in light. *Commun. Integr. Biol.* 2 : 50-55.
- Rüdiger W. 2002. Biosynthesis of chlorophyll *b* and the chlorophyll cycle. *Photosynth. Res.* 74 : 187-193.
- Sakuraba Y., Balazadeh S., Tanaka R., Mueller-Roeber B., Tanaka A. 2012. Overproduction of chl *b* retards senescence through transcriptional reprogramming in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 53 : 505-517.
- Sato Y., Morita R., Katsuma S., Nishimura M., Tanaka A., Kusaba M. 2009. Two shortchain dehydrogenase/reductases, NON-YELLOW COLORING 1 and NYC1-LIKE, are required for chlorophyll *b* and light-harvesting complex II degradation during senescence in rice. *Plant J.* 57 : 120-131.
- Satoh S., Ikeuchi M., Mimuro M., Tanaka A. 2001. Chlorophyll *b* expressed in cyanobacteria functions as a light-harvesting antenna in Photosystem I through flexibility of the proteins. *J. Biol. Chem.* 276 : 4293-4297.

- Schneegurt M.A., Beale S.I. 1992. Origin of the chlorophyll b formyl from oxygen in *Chlorella vulgaris*. *Biochemistry*. 31 : 11677-11683.
- Seely G.R. 1966. The structure and chemistry of functional groups. In: *The Chlorophylls*. Academic Press, New York, London : 67-109.
- Shi L.X., Hall M., Funk C., Schröder W.P. 2012. Photosystem II, a growing complex: updates on newly discovered components and low molecular mass proteins. *Biochim. Biophys. Acta*. 1817 : 13-25.
- Simpson D., Machold O., Hoyer-Hansen G., von Wettstein D. 1985. Chlorina mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Carlsberg Res. Commun.* 50 : 223-238.
- Sonoike K. 2011. Photoinhibition of photosystem I. *Physiol. Plant.* 142 : 56-64.
- Staelin L.A. 1996. Structure, composition, functional organization and dynamic properties of thylakoid membranes. In: *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*. Springer, Dordrecht : 11-30.
- Standfuss J., Kuhlbrandt W. 2004. The three isoforms of the light-harvesting complex II: spectroscopic features, trimer formation, and functional roles. *J. Biol. Chem.* 279 : 36884-36891.
- Standfuss J., Terwisscha van Scheltinga A.C., Lamborghini M., Kuhlbrandt W. 2005. Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *EMBO J.* 24 : 919-928.
- Storf S., Jansson S., Schmid V.H.R. 2005. Pigment binding, fluorescence properties, and oligomerization behavior of Lhca5, a novel light-harvesting protein. *J. Biol. Chem.* 280 : 5163-5168.
- Syvash, O.O., Zolotareva O. K. 2017. Regulation of chlorophyll degradation in plant tissues. *Biotechnol. Acta*. 10 : 20-30.
- Tanaka A., Ito H., Tanaka R., Tanaka N.K., Yoshida K., Okada K. 1998. Chlorophyll *a* oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll *b* formation from chlorophyll *a*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95 : 12719-12723.
- Tanaka R., Tanaka A. 2011. Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biochim. Biophys. Acta*. 1807 : 968-976.
- Thayer S.S., Björkman O. 1992. Carotenoid distribution and deepoxidation in thylakoid pigment-protein complexes from cotton leaves and bundle-sheath cells of maize. *Photosynth. Res.* 33 : 213-225.
- Thornber J.P., Highkin H.R. 1974. Composition of the photosynthetic apparatus of normal barley leaves and a mutant lacking chlorophyll *b*. *Eur. J. Biochem.* 41 : 109-116.
- Tikkanen M., Aro E.M. 2012. Thylakoid protein phosphorylation in dynamic regulation of photosystem II in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta*. 1817 : 232-238.
- Topchiy N.M., Sytnik S.K., Syvash O.O., Zolotareva O.K. 2005. The effect of additional red irradiation on the photosynthetic apparatus of *Pisum sativum*. *Photosynthetica*. 43 : 451-456.
- Veltchkova M.Y., Picorel R. 2004. Photobleaching of photosynthetic pigments in spinach thylakoid membranes. Effect of temperature, oxygen and DCMU. *Biophys. Chem.* 107 : 25-30.
- Wakao N., Yokoi N., Isoyama N., Hiraishi A., Shimada K., Kobayashi M., Kise H., Iwaki M., Itoh S., Takaichi S., Sakurai Y. 1996. Discovery of natural photosynthesis using Zn-containing bacteriochlorophyll in an aerobic bacterium *Acidiphilium rubrum*. *Plant Cell Physiol.* 37 : 889-893.
- Walladares F., Niinemets U. 2008. Shade tolerance, a key plant feature of complex nature and consequences. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 39 : 237-257.
- Watanabe T., Kobayashi M. 1988. Chlorophylls as functional molecules in photosynthesis. *Molecular composition in vivo and physical chemistry in vitro*. *J. Chem. Soc. Jap.* 4 : 383-395.
- Wientjes E., Croce R. 2011. The light-harvesting complexes of higher-plant photosystem I: lhca1/4 and Lhca2/3 form two red-emitting heterodimers. *Biochem. J.* 433 : 477-485.
- Wientjes E., van Amerongen H., Croce R. 2013. LHCI is an antenna of both photosystems after long-term acclimation. *Biochim. Biophys. Acta*. 1827 : 420-426.
- Xu H., Vavilin D., Vermaas W. 2001. Chlorophyll *b* can serve as the major pigment in functional Photosystem II complexes of cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98 : 14168-14173.
- Yakushevskaya A.E., Keegstra W., Boekema E.J., Dekker J.P., Andersson J., Jansson S., Horton P. 2003. The structure of photosystem II in Arabidopsis: localization of the CP26 and CP29 antenna complexes. *Biochemistry*. 42 : 608-613.
- Yamori W., Evans J.R., von Caemmerer S. 2010. Effects of growth and measurement light intensities on temperature dependence of CO₂ assimilation rate in tobacco leaves. *Plant Cell Environ.* 33 : 332-343.
- Zhang Y., Liu C., Liu S., Shen Y., Kuang T., Yang C. 2008. Structural stability and properties of three isoforms of the major light-harvesting chlorophyll *a/b* complexes of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*. 1777 : 479-487.

Надійшла до редакції
01.10.2018 р.

ВАРІАЦІЯ СПІВВІДНОШЕННЯ ВМІСТУ ХЛОРОФІЛІВ *a* І *b*

VARIATION OF CHLOROPHYLL *a* TO *b* RATIO AT ADAPTATION OF PLANTS TO EXTERNAL FACTORS

O. O. Syvash, N. F. Mykhaylenko, E. K. Zolotareva

*Kholodny Institute of Botany
of National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)
E-mail: membrana@ukr.net*

Adaptation of plants and microalgae to the intensity and spectral composition of the incident light occurs due to specific changes in the morphology, physiology, biochemistry and structure of leaves and chloroplasts. This review is devoted to the consideration of factors affecting the content and ratio of chlorophylls (Chl) *a/b* in photosynthetic cells. Depending on illumination level, the ultrastructure of C₃ plant chloroplasts varies; as light intensity of decreases, the number of granal thylakoids and their stacking degree increase. Plants grown at saturating light intensity are adapted to the rapid use of sunlight quanta and are characterized by high values of the Chl *a/b* ratio, the electron transport rate and a decrease in the content of light-harvesting complexes (LHC) and Chl in the photosystem II (PS II). On the contrary, C₃ plants grown at low light intensity compensate for the limited amount of light energy available for growth by increasing intensely the content of pigments and LHC and decreasing the Chl *a/b* ratio. The pigment apparatus and the ultrastructure of C₄ plant chloroplasts, genetically adapted to high light intensities, differ significantly in mesophyll and bundle sheath cells. The former are characterized by the presence of a large number of granal thylakoids with a relatively low Chl *a/b* ratio (~ 3), whereas the thylakoid system of bundle sheath cell chloroplasts is mainly lamellar with a low content of Chl *b* (*a/b* ~ 5–10). The relative content of Chl *b* in thylakoids is determined by the accumulation of pigmented antenna proteins. The LHC family of proteins includes nuclear-encoded integral proteins of the thylakoid membrane, which, when associated with the main complexes of both photosystems, form a flexible peripheral antenna to increase the light absorption cross-section. LHC regulates the efficiency of light utilization and provides protection against photo-oxidative stress. In recent years, significant progress has been made in clarifying the structure, functions and regulatory pathways with the participation of LHC; however many molecular details need clarification. The paper provides an overview of current knowledge of LHC biogenesis, starting from the regulation of the cycle of interconversion Chl *a* → Chl *b*, the organization of pigment-protein complexes to the regulation of LHC assembly and functioning under different conditions. The genes controlling these events are a potential candidate for biotechnological applications aimed at optimizing the efficiency of photosynthetic organisms utilization.

Key words: *chlorophyll a, chlorophyll b, pigment-protein complexes, photosystems, chlorophyll metabolism, mutants, spectrophotometrical analysis*

ВАРІАЦІЯ СООТНОШЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ХЛОРОФИЛЛОВ *a* И *b* ПРИ АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ К ВНЕШНИМ ФАКТОРАМ

A. A. Сиваш, Н. Ф. Михайленко, Е. К. Золотарева

*Институт ботаники им. Н.Г. Холодного
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)
E-mail: membrana@ukr.net*

Адаптация растений и микроводорослей к интенсивности и спектральному составу падающего света происходит благодаря конкретным изменениям в морфологии, физиологии, биохимии и структуре листьев и хлоропластов. Обзор посвящен рассмотрению факторов, влияющих на содержание и соотношение хлорофиллов (Хл) *a/b* в фотосинтетических клетках. В зависимости от уровня освещенности варьирует ультраструктура хлоропластов C₃-растений: при снижении интенсивности света увеличивается количество гранальных тилакоидов и степень их стекинга. Растения, выращенные при насыщающей интенсивности света, адаптированы к быстрому использованию квантов солнечного света и характеризуются высокими зна-

чениями соотношения Хл a/b , скорости электронного транспорта и снижением содержания светособирающих комплексов (ССК) и Хл в фотосистеме II (ФС II). C_3 -растения, выращенные при низкой интенсивности света, напротив, компенсируют ограниченное количество доступной для роста световой энергии интенсивным увеличением содержания пигментов и ССК и уменьшением соотношения Хл a/b . Пигментный аппарат и ультраструктура хлоропластов C_4 -растений, генетически адаптированных к высоким интенсивностям света, существенно отличаются в клетках мезофилла и обкладки проводящих пучков. Для первых характерно наличие большого количества гранальных тилакоидов при относительно невысоком соотношении Хл a/b (~ 3), тогда как тилакоидная система хлоропластов в проводящих пучках является по преимуществу ламеллярной с низким содержанием Хл b (соотношение $a/b \sim 5-10$). Относительное содержание Хл b в тилакоидах определяется накоплением пигментированных антенных белков. Семейство белков ССК включает в себя ядерно-кодированные интегральные белки тилакоидной мембраны, которые при ассоциации с основными комплексами обеих фотосистем образуют гибкую периферическую антенну для увеличения поперечного сечения поглощения света. ССК регулирует эффективность утилизации света и обеспечивает защиту от фотоокислительного стресса. В последние годы был достигнут значительный прогресс в выяснении структуры, функций и регуляторных путей с участием ССК; однако многие молекулярные детали требуют уточнения. В работе приведен обзор текущих знаний о биогенезе ССК, начиная от регуляции цикла взаимопревращения Хл $a \rightarrow$ Хл b , организации пигмент-белковых комплексов до регуляции сборки и функционирования ССК в разных условиях. Гены, контролирующие эти события, являются потенциальным кандидатом для биотехнологических применений, направленных на оптимизацию эффективности использования фотосинтетических организмов.

Ключевые слова: *хлорофилл a , хлорофилл b , пигмент-белковые комплексы, фотосистемы, метаболизм хлорофиллов, мутанты, спектрофотометрический анализ*