

ANALIZA PROCESU WIĄZANIA FITOCHROMU Z BŁONAMI  
POD WPŁYWEM ŚWIATŁA I TEMPERATURY\*

Ewa Miedziejko, Grażyna Weymann, Andrzej Szymański

Akademia Rolnicza oraz Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Instytut Fizyki i Chemii AR,  
60-625, Poznań, ul. Wojska Polskiego 75

Badania spektralne fitochromu wyjaśniły w znacznej mierze mechanizm reakcji fizjologicznych, w których efekt działania impulsu światła bliskiej czerwieni jest całkowicie odwracany przez następcze działanie światła dalekiej czerwieni (reakcje indukcji). Mechanizm reakcji fizjologicznych zachodzących w warunkach ciągłego oświetlenia (reakcje wysokiej energii) nie jest znany. Reakcje fizjologiczne w roślinach zachodzą w warunkach periodu światło-ciemność i podlegają prawu odwracalności w indukcyjnym okresie ciemności oraz specyficznej zależności od natężenia i składu spektralnego promieniowania w warunkach ciągłego oświetlenia. Większość procesów wymaga zatem współdziałania obu typów reakcji. Ogólny model działania fitochromu obejmujący reakcje indukcji i wysokiej energii umożliwił odkrycie procesu wiązania fitochromu z błonami pod wpływem światła [6, 8].

Asocjacja fitochromu z materiałem błonowym jest stabilna w warunkach krótkotrwałej ekstrakcji w obecności jonów  $Mg^{2+}$ . Umożliwia to uzyskanie roztworów, które mogą być badane metodami spektrometrycznymi. Metody te wykorzystywano do określenia wpływu temperatury, gęstości energii świetlnej oraz periodu światło-ciemność na zawartość fitochromu związanego z błonami oraz na czas połowicznej przemiany reakcji wiązania fitochromu z frakcją błonową. Obiektami badań były preparaty otrzymane z siewek rzepaku ozimego pod-

---

\*Praca ta realizowana była w ramach badań finansowanych przez MSzWiT/PAN w problemie II/7.

danych programowanemu procesowi deetiolacji. Celem prowadzonych badań było sprawdzenie hipotezy Fuada [2], który zakłada, że wiązanie fitochromu z błonami zachodzi niezależnie od stanu fototransformacji barwnika. Proces wiązania fitochromu z błonami w siewkach rzepaku ozimego nie był dotychczas badany.

### MATERIAŁ I METODY

Siewki rzepaku odmiany Górczański hodowano w komorze klimatycznej przez 5 dni w całkowitej ciemności, w temperaturze 298 K. Do badań wykorzystywano jednakowe ilości (1-2) cm odcinków hipokotyli. Po naświetleniu, zgodnie z określonym programem, fitochrom związany z frakcją błonową otrzymywano według procedury Quaila [6]. Proces ekstrakcji przeprowadzono w świetle zielonym o niewielkim natężeniu w temperaturze 277 K. W celu eliminacji jonów metali wszystkie stosowane odczynniki krystalizowano dwukrotnie z EDTA. Stabilizację mocy promieni, w procesie deetiolacji siewek, gwarantowało stosowanie źródeł laserowych. Wykorzystano:

- laser He-Ne o mocy 0,6 mW, długości fali  $\lambda = 633$  nm i średnicy wiązki 2 mm; aby oświetlić całą powierzchnię i kuwety zastosowano soczewkę rozpraszającą, ze względu na małą objętość kuwety wiązka w jej wnętrzu była równoległa;

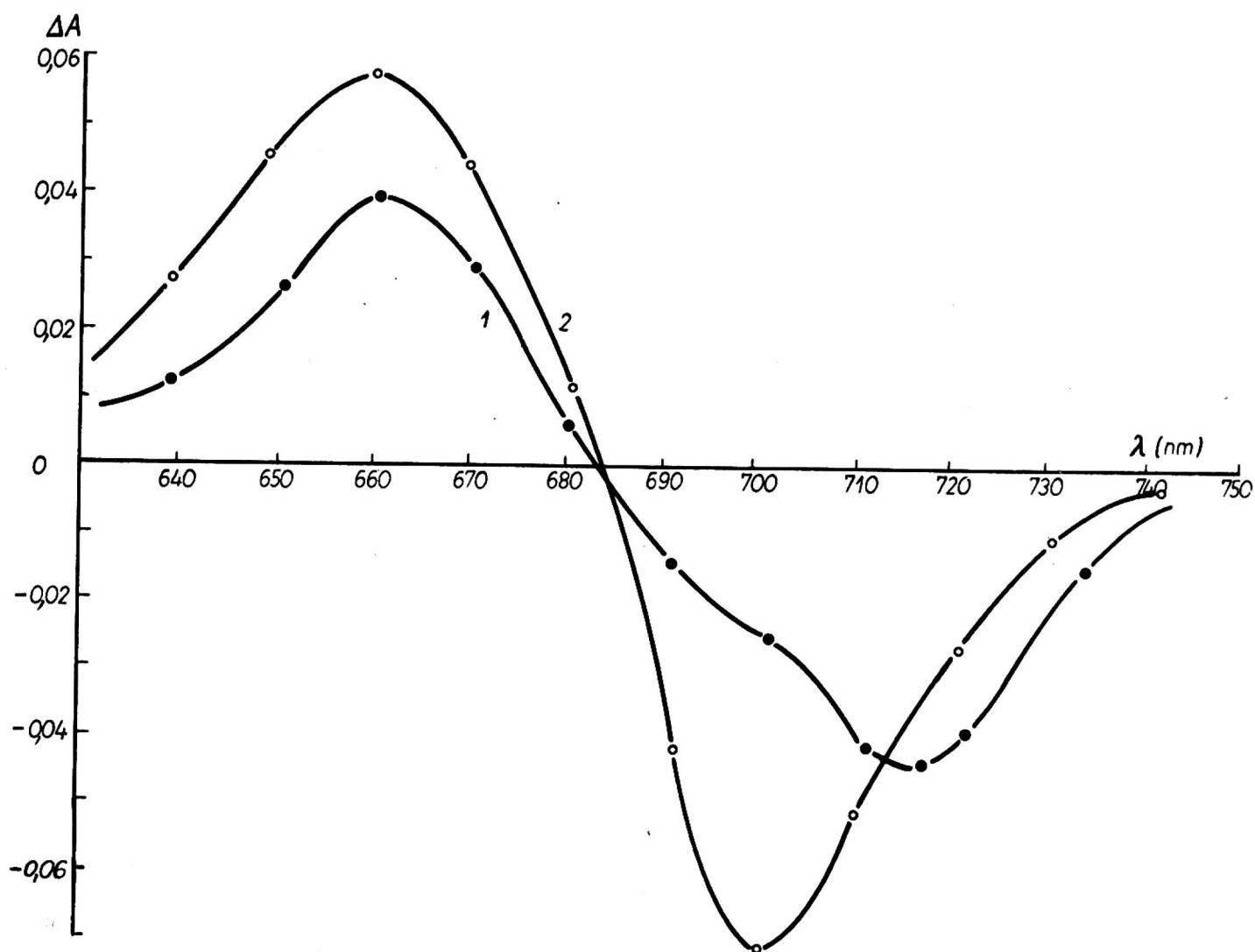
- laser rubinowy pracujący w warunkach swobodnej generacji o energii 0,9 J i długości fali  $\lambda = 694$  nm; w czasie naświetlania prowadzono równoczesny pomiar energii oparty na zasadzie termoelektrycznej.

Do napromieniowania aktywnego, czyli oddziałującego chemicznie, stosowano lampę wolframową i filtry interferencyjne wycinające pasma około 660 i 725 nm. Natężenie promieni odpowiednio  $12 \text{ W/m}^2$  oraz  $11 \text{ W/m}^2$  było wystarczające do uzyskania fotokonwersji barwnika w czasie 30 sekund. Pomiar absorpcji wykonano w układzie termostatowanym w temperaturze 291 K na spektrofotometrze Cary 119 i spektrofotometrze VSU-2P Zeiss. W celu zwiększenia zmian absorpcji, widma różnicowe fitochromu mierzono w zawiesinie 1,3 g węglanu wapnia i 1 ml ekstraktu fitochromu [1]. Współczynnik zwielokrotnienia wyznaczono w zawiesinie zredukowanego cytochromu c o znanym stężeniu dla absorpcji w pasmie  $\alpha$  i  $\beta$ . Przy stosowanej geometrii wynosił on 50. Zawartość fitochromu we frakcjach rozpuszczalnej i związanej z błonami mierzono każdorazowo z różnico-

wych zmian absorpcji  $\Delta A$  po fotokonwersji barwnika  $F_R \xrightleftharpoons[730 \text{ nm}]{660 \text{ nm}} F_{FR}$ ;  $F_{FR}$  ( $F_R$  i  $F_{FR}$  - formy fitochromu absorbujące światło odpowiednio bliskiej i dalekiej czerwieni [4]). Całkowita zawartość fitochromu wynosiła  $\Delta(\Delta A) = 2 \times 10^{-5}$ /hipokotyl i była niezależna od programu deetiolacji. Z pomiarów tych wyznaczono skład fitochromu związanego z frakcją błonową % (F)<sub>p</sub> [6].

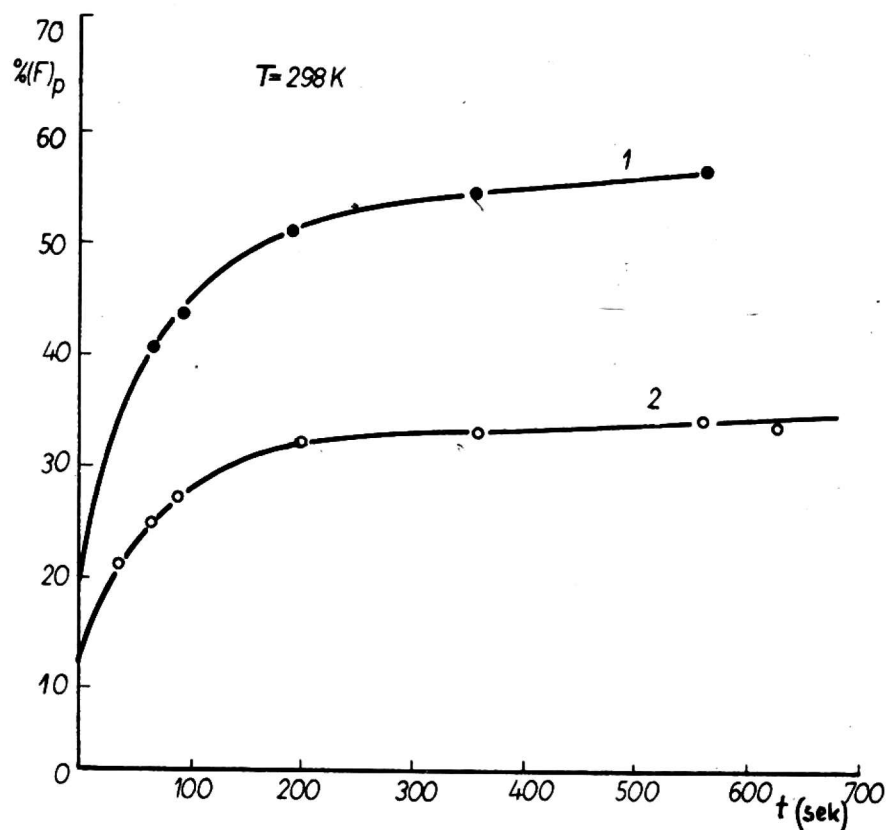
### WYNIKI I DYSKUSJA

Widmo różnicowe fitochromu związanego z frakcją błonową pod wpływem promieniowania o długości fali  $\lambda = 633 \text{ nm}$  i natężeniu energii  $240 \text{ J/m}^2$  (rys. 1) posiada minimum o długości fali  $\lambda = 715 \text{ nm}$ , charakterystyczne dla formy fitochromu związanej z błonami [7].



Rys. 1. Widmo różnicowe fitochromu związanego z frakcją błonową pod wpływem promieniowania o energii  $240 \text{ J/m}^2$  i długości fali  $\lambda = 633 \text{ nm}$ . Obcięte segmenty hipokotylowe rzepaku naświetlano i indukowano w ciemności w temperaturze  $278 \text{ K}$ . Ekstrakcję przeprowadzano bezpośrednio po okresie inkubacji (krzywa 1) lub po powtórnym naświetleniu (krzywa 2). Pomiar absorpcji wykonano w zawiesinie  $1,3 \text{ g CaCO}_3$  i  $1 \text{ ml}$  ekstraktu fitochromu

Kinetyka reakcji wiązania fitochromu z błonami pod wpływem promieniowania o natężeniu energii  $1 \text{ kJ/m}^2$  i długości fali  $\lambda = 633 \text{ nm}$  i  $\lambda = 694 \text{ nm}$  przebiega w trzech stadiach z czasem połowicznej przemiany odpowiednio 1 i 2 s, 3 i 5 s oraz 90 i 180 s (rys. 2). Zatem wiązanie fitochromu z błonami zachodzi zarówno pod wpływem światła bliskiej jak i dalekiej czerwieni, jednak proces ten zachodzi wydajniej i szybciej dla fitochromu w formie  $F_{FR}$ .

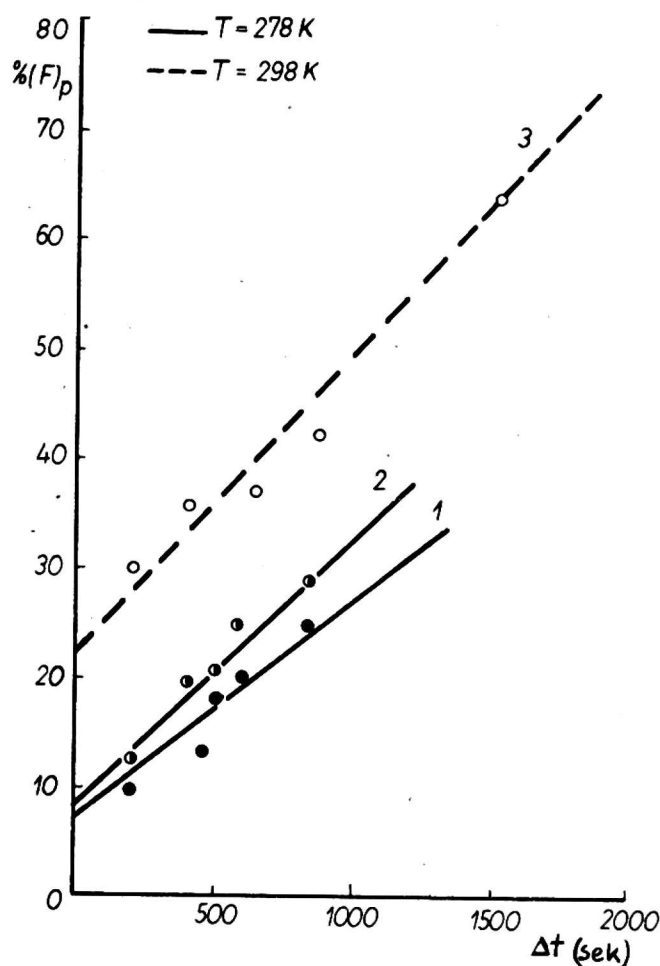


Rys. 2. Kinetyka wiązania fitochromu z frakcją błonową pod wpływem promieniowania o długości fali  $\lambda = 633 \text{ nm}$  (krzywa 1) i  $\lambda = 694 \text{ nm}$  (krzywa 2) i gęstości energii  $1 \text{ kJ/m}^2$

Powtórny impuls światła czerwonego po różnym czasie inkubacji w ciemności (rys. 3) zwiększa zawartość fitochromu związanego z frakcją błonową wprost proporcjonalnie do natężenia energii, temperatury w której zachodzi inkubacja i naświetlanie oraz czasu trwania inkubacji. Czas połowicznej przemiany maleje od 13 s do 6 s ze wzrostem temperatury o 20 K. Gdy natężenie energii inicjującej maleje o  $140 \text{ J/m}^2$ , czas połowicznej przemiany wzrasta do 16 s. Proces ten wymaga energii aktywacji  $21 \text{ kJ/mol}$ . Wartość ta jest około trzykrotnie mniejsza od znalezionej przez Lehmana [3] dla kukurydzy w programie deetioloacji czerwień-ciemność-daleka czerwień. Zgodnie z modelem Schäfera [9] drugi impuls światła da-

lekkiej czerwieni powoduje częściową dysocjację wiązania molekuly fitochromu z nieznanym receptorem błonowym. Program deetiolacji zastosowany w tej pracy prowadzi natomiast do gromadzenia pośrednich form fotokonwersyjnych. Oszacowana wartość entalpii aktywacji rzędu 18 kJ/mol wskazuje [5], że jest to przypuszczalnie forma lumi-R o maksimum absorpcji 698 nm [10]. Potwierdza to również przesunięcie do 700 nm minimum widma różnicowego fitochromu związanego z frakcją błonową (rys. 1, krzywa 2). Prezentowane wyniki wykazują, że aktywowana wystarczającą energią promieniowania, niezależnie od stanu transformacji, molekula fitochromu wiąże się z błonami.

Rys. 3. Wpływ temperatury, gęstości energii oraz periodu światło-ciemność na kinetykę procesu wiązania fitochromu z frakcją błonową. Obcięte segmenty hipokotylowe rzepaku naświetlano promieniowaniem o natężeniu energii  $100 \text{ J/m}^2$  (krzywa 1) lub  $240 \text{ J/m}^2$  (krzywa 2,3) i długości fali  $\lambda = 633 \text{ nm}$ , a następnie inkubowano w różnym czasie w stałej temperaturze. Bezpośrednio przed ekstrakcją powtarzano program naświetlania



#### LITERATURA

1. Butler W. L., Norris K. H.: Arch. Biochem. Biophys. 87, 31-40 1960
2. Fuad N., Yu R.: Photochem. Photobiol. 25, 491-496, 1977
3. Lehmann U., Schäfer E.: Photochem. Photobiol. 27, 767-773, 1978
4. Miedziejko E., Weymann G., Pyda M.: Roczn. AR w Poznaniu CVIII, 91-98, 1978
5. Pratt L. H., Butler W. L.: Photochem. Photobiol. 11, 361-369 1970

6. Quail P. H., Marmé D., Schäfer E.: Nature (New Biol.) 245, 189-190, 1973
7. Quail P. H.: Planta 118, 345-355, 1974
8. Rubinstein B., Drury K. S., Park R. B.: Plant Physiol. 44, 105-109, 1968
9. Schäfer E.: J. Math. Biol. 2, 41-56, 1975
10. Spruit C. J. P., Kendrick R. E., Cooke R. J.: Planta 127, 121-132, 1975

Э. Медзейко, Г. Вейманн, А. Шиманьски

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА СВЯЗЫВАНИЯ ФИТОХРОМА С МЕМБРАНАМИ  
ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ОБЛУЧЕНИЯ И ТЕМПЕРАТУРЫ

Р е з ю м е

В гипокотыльных отрезках озимого рапса, при воздействии облучения, проявляется зависимый от энергии радиации, температуры и периодов свет-темнота процесс связывания фитохрома с мембранами. Молекулы фитохрома поступают в эту связь независимо от стадий фототрансформации если только они активированы достаточно высокой энергией облучения.

E. Miedziejko, G. Weymann, A. Szymański

STUDIES ON PHYTOCHROME BINDING PROCESS TO A MEMBRANE  
FRACTION AS A FUNCTION OF THE LIGHT AND TEMPERATURE

S u m m a r y

The induced by irradiation process of binding phytochrome to membranes, in cut hypocotyle segments of winter - rape, appears to be a function of energy, temperature and light-dark period. After absorbing sufficient energy activated molecule of phytochrome binds to the membrane independently of its transformation.