

ПРОБЛЕМА СПЕКТРАЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТИ ПУТЕЙ БИОСИНТЕЗА ХЛОРОФИЛЛА В ЛИСТЯХ РАСТЕНИЙ

©2015 г. О. Б. БЕЛЯЕВА, Ф. Ф. ЛИТВИН

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Москва*

I. Введение. II. Общая схема реакций биосинтеза различных форм хлорофилла при зеленении этиолированных листьев. III. Первичные реакции фотовосстановления протохлорофиллида: нефлуоресцирующие интермедиаты и первичные флуоресцирующие формы хлорофилла. IV. Зависимость путей образования различных форм хлорофилла от спектрального состава освещения этиолированных листьев. V. Заключительные стадии биосинтеза хлорофилла в зеленых листьях растений. VI. Заключение

I. ВВЕДЕНИЕ

В зеленых листьях растений осуществляется интенсивный синтез хлорофилла. Заключительная светозависимая стадия этого процесса представляет собой сочетание реакций различной природы: фотофизических, фотохимических и биохимических. В результате многоступенчатого и разветвляющегося процесса осуществляются не только синтез молекулы хлорофилла, но и формируется несколько типов специфических пигмент-белковых структур, обеспечивающих функционирование двух фотосистем фотосинтеза и светособирающих комплексов. Высокая концентрация хлорофилла в зеленых листьях создает методические трудности на пути исследования механизма его фотохимического образования из непосредственного предшественника протохлорофиллида, поскольку содержание протохлорофиллида и интермедиатов его превращения на два-три порядка ниже, чем самого хлорофилла. Это обстоятельство объясняет обращение исследователей к изучению биосинтеза хлорофилла на

Принятые сокращения: Пхл – протохлорофилл; Пхлд – протохлорофиллид; Хл – хлорофилл; Хлд – хлорофиллид; ПОР – протохлорофиллид-оксидоредуктаза; Фео – феофитин; РЦ – реакционные центры; ФС1 – фотосистема 1; ФС2 – фотосистема 2.

Адрес для корреспонденции: belyaeva0104@gmail.com.

объектах с низким содержанием пигментов: этиолированных (выращенных в полной темноте), или находящихся на ранних стадиях зеленения растений. Накопленный в таких экспериментах арсенал методов и новые современные методические подходы позволяют обратиться к изучению биосинтеза хлорофилла непосредственно в зеленых листьях растений.

Необходимо подчеркнуть, что результаты исследования зеленения этиолированных растений имеют не только фундаментальный, но и важный прикладной аспект, так как прорастание и деэтиоляция растений во многом определяют продуктивность и успехи сельскохозяйственного производства.

Важнейшими методами исследования заключительного этапа биосинтеза хлорофилла служат спектральные методы. Фотосинтетические пигменты в растворе и в составе пигмент-белковых комплексов имеют характерные спектры в видимой области. Их исследование дает многостороннюю информацию не только об изменениях структуры молекул, но и о межмолекулярных пигмент-пигментных и пигмент-белковых взаимодействиях. В листьях растений, как этиолированных, так и зеленых, существует несколько спектрально различных форм протохлорофиллида. Основными можно считать формы Пхлд 633/628, Пхлд 643/637 и обычно доминирующую форму Пхлд 655/650 (цифрами указано положение максимумов флуоресценции и поглощения) [1–5]. Кроме того обнаружено несколько минорных длинноволновых форм [5–10]. Основная масса хлорофилла синтезируется путем превращения доминирующей формы предшественника Хлд 655/650.

II. ОБЩАЯ СХЕМА РЕАКЦИЙ БИОСИНТЕЗА РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ХЛОРОФИЛЛА ПРИ ЗЕЛЕНЕНИИ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ЛИСТЬЕВ

Результаты многолетних исследований биосинтеза хлорофилла в этиолированных листьях позволили заключить, что светозависимая стадия биосинтеза различных форм хлорофилла в листе представляет собой сложную разветвленную цепь фотохимических и темновых реакций, в которой участвуют несколько форм предшественника хлорофилла. История постепенного развития и усложнения общей схемы реакций светозависимой стадии биосинтеза хлорофилла изложена в работах [11, 12]. Нами была предложена общая схема реакций биосинтеза основных форм хлорофилла реакционных центров фотосистем и светособирающего комплекса [12, 13] (рис.),

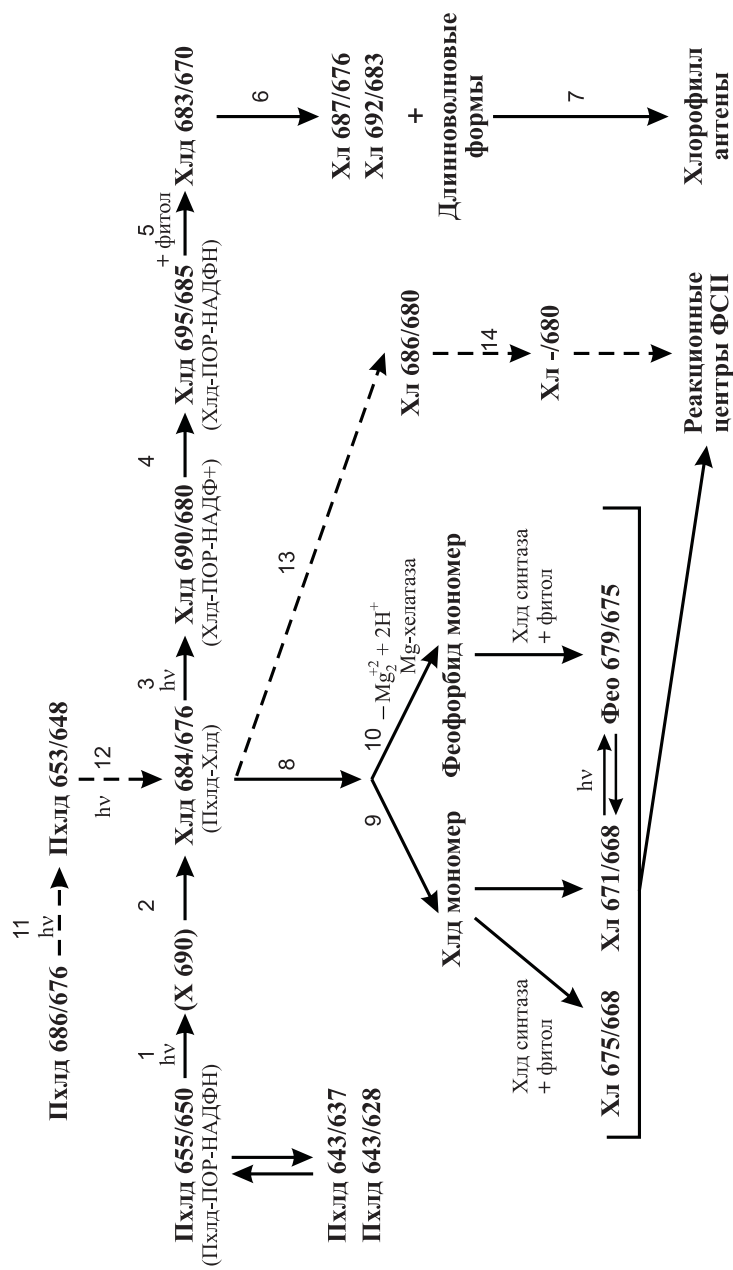


Рис. Общая схема превращений хромофора пигмента на световой стадии биосинтеза хлорофилла в листьях растений. Пхллд – протохлорофиллид, Хлд – хлорофиллид, Хл – хлорофилл. Цифрами указаны положения максимумов флуоресценции (первый индекс) и поглощения (второй индекс) пигментных форм. Пунктирными стрелками обозначен путь формирования пигмента Р-680 из длинноволновой формы протохлорофиллида.

включающая первичные фотофизические реакции фотовосстановления протохлорофиллида (реакции 1 и 2 на схеме, см. обзор [14]), а также разветвляющиеся и параллельные пути образования хлорофилл-белковых комплексов светособирающих антенн (реакции 3–7 на схеме), хлорофиллов и феофитина реакционных центров ФС2 (реакции 8–14 на схеме, см. обзор [13]). Менее изучены пути биогенеза реакционных центров фотосистемы I. Однако, при исследовании образования хлорофилла в клетках мутанта *Chlorella vulgaris* В-15 с полным генетическим блоком темнового синтеза хлорофилла [15] наряду с известными для зеленеющих водорослей фотореакциями коротковолновых форм протохлорофиллида Пхлд 655/650 и Пхлд 640/635 было обнаружено фотопревращение длинноволновой этерифицированной формы предшественника хлорофилла Пхл 682/672 в стабильную форму хлорофилла Хл 715/696. Было высказано и обосновано предположение о том, что Хл 715/696 является пигментом РЦ ФС1.

Чоэфс и Франк [16] предложили циклическую схему биосинтеза хлорофилла и регенерации фотоактивного комплекса протохлорофиллида, два цикла которой практически соответствуют прямой и ответвляющейся последовательностям реакций в нашей схеме.

III. ПЕРВИЧНЫЕ РЕАКЦИИ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ ПРОТОХЛОРОФИЛЛИДА: НЕФЛУОРЕСЦИРУЮЩИЕ ИНТЕРМЕДИАТЫ И ПЕРВИЧНЫЕ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИЕ ФОРМЫ ХЛОРОФИЛЛА

Ключевой реакцией заключительной световой стадии биосинтеза хлорофилла в листьях растений служит фотовосстановление его непосредственного предшественника протохлорофиллида (реакции 1 и 2 на общей схеме). Эта реакция представляет собой присоединение двух атомов водорода в положениях С17 и С18 двойной связи молекулы протохлорофиллида. Высокая эффективность фотореакции в этиолированных листьях обусловлена тем, что она осуществляется внутри фотоактивного комплекса, включающего протохлорофиллид, донор водорода НАДФН и фотофермент протохлорофиллид оксидоредуктазу (ПОР) (см. обзор [17]). Благодаря структуре активного тройного комплекса создаются благоприятные для реакции фотовосстановления пространственные отношения протохлорофиллида и доноров водорода.

НЕФЛУОРЕСЦИРУЮЩИЕ ИНТЕРМЕДИАТЫ

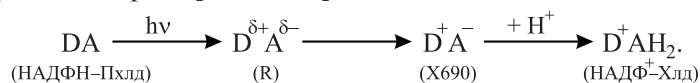
С помощью низкотемпературной спектроскопии и спектроскопии высокого временного разрешения было обнаружено, что фотовосстановление протохлорофиллида представляет собой достаточно сложный процесс, включающий несколько быстрых световых и темновых реакций, с образованием промежуточных короткоживущих продуктов двух или трех интермедиатов, которые характеризуются сильным тушением флуоресценции протохлорофиллида [12, 18–44].

Нами была предложена следующая схема первичных реакций [37]:



Здесь R и X 690 – нефлуоресцирующие интермедиаты, один из которых (X 690), возможно, включает два параллельно образующихся с разной скоростью компонента: R 697 и R 688 (цифры соответствуют максимумам поглощения).

Короткоживущие интермедиаты R и X 690 характеризуется синглетным сигналом ЭПР с g-фактором свободного электрона [35, 36, 38]. Результаты исследований свидетельствуют об образовании комплексов с переносом заряда на первичной фотофизической стадии биосинтеза хлорофилла [12, 43, 45]. Судя по спектральным характеристикам двух нефлуоресцирующих интермедиатов *in vivo* (R и X 690), можно предположить, что их фотоиндуцированное образование соответствует формированию комплексов с частичным и полным переносом заряда [12, 45, 46]:



Результаты исследования первичных реакций фотовосстановления протохлорофиллида в реконструированных тройных комплексах: Пхлд–ПОР–НАДФН при 180 К с помощью абсорбционной спектроскопии, ЭПР-спектроскопии, ЭНДОР-спектроскопии и Штарк-спектроскопии [43] позволили сделать предположение о том, что образование нефлуоресцирующего интермедиата вовлекает перенос гидрид-иона для создания комплекса с переносом заряда. Было высказано предположение, что поглощение фотона молекулой протохлорофиллида приводит к временному разделению зарядов по двойной связи C17=C18, способствующему ультра быстрому переносу гидрид-иона от НАДФН к атому C17 протохлорофиллида [43, 47]. Образующийся комплекс с переносом заряда облегчает перенос протона к атому C18 в последующей темновой реакции.

ПЕРВИЧНЫЕ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИЕ ФОРМЫ ХЛОРОФИЛЛА

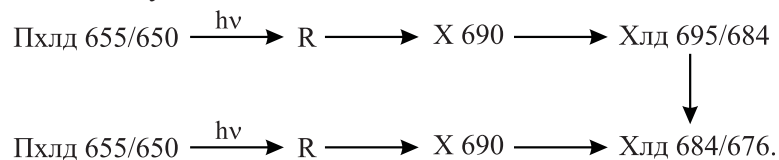
Нефлуоресцирующий интермедиат X 690, образующийся под действием света при низких температурах, превращается в хлорофиллид темновым путем после повышения температуры освещенного образца. При использовании интегрального белого света для освещения этиолированных листьев при 77 К после повышения температуры наблюдается практически одновременное образование двух первичных форм хлорофиллида с максимумами флуоресценции при 695 и 684 нм и соответствующими полосами поглощения при 684 и 676 нм [27, 28, 48]. Соотношение полос зависит от температуры освещения и спектрального состава света. Затем форма Хлд 695/684 превращается в более коротковолновую форму Хлд 684/676 в результате темновой реакции. В препаратах этиопластов наблюдалось образование только одной, более коротковолновой первичной формы хлорофиллида.

Результаты исследований первичных реакций фотовосстановления протохлорофиллида в листьях растений с помощью флуоресцентной спектроскопии высокого временного разрешения [49] показали, что темновое превращение нефлуоресцирующих интермедиатов приводит к образованию четырех первичных форм хлорофиллида, характеризующихся максимумами флуоресценции при 684, 690, 695–697 и 706 нм. Аналогичные результаты были получены при исследовании первичных флуоресцирующих форм хлорофиллида с помощью дифференциальной спектроскопии и разложения разностных спектров флуоресценции на составляющие гауссовы компоненты [48]. Было обнаружено, что длинноволновые первичные формы хлорофиллида с максимумами флуоресценции при 696 и 706 нм в дальнейшем при комнатной температуре превращаются в более коротковолновые формы с максимумами флуоресценции, соответственно, при 675 и 684 нм. Форма с максимумом флуоресценции при 684 нм, по всей вероятности, представляет собой форму хлорофиллида – Хлд 684/676, служащую исходной формой на пути биосинтеза пигментов реакционного центра второй фотосистемы и светособирающего комплекса (реакция 2 на схеме рис 1). По-видимому, образование нескольких первичных лабильных форм хлорофиллида свидетельствует о раннем дифференцировании путей формирования функционально различных нативных пигментных форм.

IV. ЗАВИСИМОСТЬ ПУТЕЙ ОБРАЗОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ХЛОРОФИЛЛА В ЭТИОЛИРОВАННЫХ ЛИСТЬЯХ ОТ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА ДЕЙСТВУЮЩЕГО СВЕТА

ПОРЯДОК ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВИЧНЫХ ФОРМ ХЛОРОФИЛЛИДА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА СВЕТА

Как было упомянуто выше, соотношение появляющихся после освещения при низкой температуре полос при 695 и 684 нм зависит от спектрального состава действующего света. Специальные эксперименты [11, 45] показали, что использование для освещения синего света (с максимумом при 470 нм) приводит к образованию в спектре флуоресценции после повышения температуры только полосы при 695 нм, которая постепенно сдвигается до 684 нм. В результате освещения листьев красным светом (более 600 нм) после повышения температуры объекта в спектре появлялся лишь один более коротковолновый максимум при 684 нм. Эти данные позволили предположить, что в этиолированных листьях существует два вида активного протохлорофиллид-белкового комплекса с практически одинаковыми спектральными характеристиками в красной области. Обе формы превращаются в хлорофиллид через стадию образования нефлуоресцирующего интермедиата. Один из предшественников способен превращаться сразу в более коротковолновую форму хлорофиллида Хлд 684/676. Гипотетическую схему реакций можно представить в следующем виде:



Позднее было обнаружено существование *in vivo* дополнительной активной формы протохлорофиллида Пхлд 653/648, близкой по спектральным характеристикам к основной активной форме [9, 50]. Кроме того не исключено, что второй путь может осуществляться за счет превращения более коротковолновой активной формы предшественника Пхлд 643/637, флуоресценция которой потушена в результате высоко эффективной миграции энергии на основную активную форму. С помощью методов производной спектроскопии и разложения разностного спектра флуоресценции «свет минус темнота» на составляющие гауссовы компоненты [9] было обнаружено, что полоса флуоресценции фотоактивной формы Хлд 655/650 включает два компонента с максимумами при 653 и 657 нм. Форма Пхл 653/648 мак-

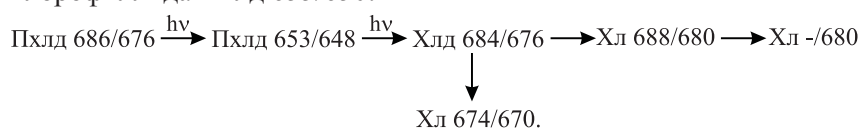
симально накапливается в очень молодых (2–3 дня) этиолированных листьях, когда еще не сформировались проламеллярные тела [16, 51], обнаруживается в зеленых листьях растений, выращиваемых в нормальных фотопериодических условиях, после темного периода [9] и в зеленеющих листьях после нескольких часов освещения, когда разрушаются проламеллярные тела и развиваются тилакоиды [52]. В работе Игнатова и Литвина [50] было обнаружено, что форма Пхлд 653/648 образуется под действием красного света из минорной длинноволновой формы Пхлд 686/676.

ОБРАЗОВАНИЕ ХЛОРОФИЛЛА РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ
ФОТОСИСТЕМЫ 2 В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ НА РАННЕЙ
СТАДИИ ЭТИОЛЯЦИИ. РОЛЬ ДЛИННОВОЛНОВОЙ ФОРМЫ
ПРОТОХЛОРОФИЛЛИДА

Выяснение пути биосинтеза хлорофилла РЦ ФС2 Р-680 стало возможным благодаря использованию для освещения этиолированных листьев света различной длины волны при исследовании процесса биосинтеза нативных форм хлорофилла в молодых листьях этиолированных растений (3–4 дня после прорастания семян) [50]. Кратковременное освещение молодых этиолированных растений белым светом приводило (как и в случае 7–10 дневных этиолированных растений) к образованию хлорофиллида Хлд 684/676 – продукта первой фотореакции. Однако, этот интермедиат при комнатной температуре участвует уже не в одной (как у 7–10 дневных листьев), а в двух темновых реакциях: Хлд 684/676 → Хл 675/670 и Хлд 684/676 → Хл 688/680 → Хл -/680 (реакции 8 и 13 на схеме). При исследовании процесса в молодых растениях было обнаружено, что в течение первых 3–5 секунд освещения белым светом накапливается Хлд 684/676 без заметных изменений полос поглощения и флуоресценции протохлорофиллида Пхлд 655/650, хотя фотопревращение протохлорофиллида (судя по экстрактам) при этом происходило. Опыты с использованием монохроматического освещения в длинноволновой области (680 нм) при температуре 4°C, позволили прийти к заключению, что эта парадоксальная лаг-фаза является кажущейся. Она объясняется фотопревращением слабофлуоресцирующей длинноволновой формы протохлорофиллида Пд 686/676 в протохлорофиллид Пд 653/648, который в результате следующей световой реакции превращается в хлорофиллид Хд 684/676 (реакции 11, 12 на схеме).

Таким образом, на ранних стадиях развития растений кроме основной разветвленной цепи реакций, в ювенильных этиолирован-

ных растениях удалось обнаружить существование дополнительного пути превращений протохлорофиллида, приводящего к синтезу нефлуоресцирующего хлорофилла Хл-680 (возможно, пигмента РЦ ФС-2) из длинноволнового протохлорофиллида Пхлд 686/676 через стадию образования Пхлд 653/648, формы, которая по спектральным свойствам очень близка (но не идентична) основной форме протохлорофиллида Пхлд 655/650:



Приоритетное формирование комплекса предшественника для реакционных центров при прорастании семян, по-видимому, не является случайным и обуславливает своим ранним биогенезом первоочередное формирование реакционных центров по сравнению с другими компонентами ФС2.

Осуществляющееся в ювенильных листьях фотопревращение длинноволновой формы протохлорофиллида Пхлд 686/676(440) в более коротковолновую форму может быть связано с фотодеагрегацией крупных олигомеров протохлорофиллида в более мелкие для создания необходимых стерических условий при фотовосстановлении протохлорофиллида до хлорофиллида. Деагрегация димера ПОР в данном случае представлялась маловероятной, так как фотореакция Пхлд 686/676(440) \rightarrow Пхлд 653/648(440) наблюдается и при 77 К. В пользу деагрегационной гипотезы свидетельствует и тот факт, что эта фотореакция блокируется в присутствии D₂O – ингибитора деагрегации пигментов в Хлд/Пхлд-содержащих комплексах зеленеющих листьев [50]. С увеличением возраста этиолированных растений происходит накопление основной активной формы протохлорофиллида Пхлд 655/650(448), фоторпревращение которой приводит в основном к образованию хлорофилла антенны.

Как было замечено, путь биосинтеза пигмента Р-680 реакционного центра второй фотосистемы из длинноволновой формы протохлорофиллида удалось наблюдать с помощью спектральных методов при освещении этиолированных листьев красным светом при температуре 4°C. При комнатной температуре эти реакции (реакции 11 и 12 на схеме) труднее обнаружить, поскольку в этих условиях под действием длинноволнового освещения превращается также основная форма предшественника хлорофилла Пхлд 655/650 и осуществляются оба параллельных пути реакций.

Как было показано в наших исследованиях с использованием монохроматического освещения 690 нм (с помощью монохроматора) [53], или 694 нм (с использованием рубинового лазера) [54], при комнатной температуре длинноволновая форма протохлорофиллида Пхлд 697/710 и вновь синтезированный хлорофиллид сенсibiliзируют фотопревращение основной формы предшественника Пхлд 655/650. При уменьшении температуры сенсibiliзация Пхлд 655/650 резко падала.

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что часть минорных длинноволновых форм протохлорофилла включена в состав фотоактивного комплекса предшественника хлорофилла и не только связана энергетически с основной формой протохлорофиллида П 655/650, но и непосредственно участвует в процессе образования хлорофилла, в частности хлорофилла реакционных центров второй фотосистемы.

V. ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ СТАДИИ БИОСИНТЕЗА ХЛОРОФИЛЛА В ЗЕЛЕННЫХ ЛИСТЯХ РАСТЕНИЙ

Возникает вопрос о том, одинаковы или нет пути и механизмы фотобиосинтеза хлорофилла в зеленеющих листьях и при накоплении и обновлении его запаса во взрослых зеленых листьях растений, когда синтезируется основная масса пигмента. Этот процесс обеспечивает необходимую мощность фотосинтеза, высокий уровень поглощения световой энергии (антенна) и ее трансформацию в энергию химических связей. При этом высокая скорость биосинтеза хлорофилла должна одновременно обеспечивать не только накопление пигмента в растущих листьях, но и компенсировать его убыль в процессах деструкции, в частности, фотодеструкции, особенно сильной на ярком свете.

При использовании метода низкотемпературной (77 К) флуоресцентной спектrophотометрии, позволяющего уменьшить перекрытие спектральных полос хлорофилла и протохлорофиллида было показано, что при затемнении зеленых листьев в них накапливается предшественник хлорофилла, спектроскопически идентичный основной активной форме протохлорофиллида в этиолированных листьях (основной максимум флуоресценции при 655 нм), быстро исчезающий при последующем освещении затемненных листьев [9, 55–58]. В работе [58] было обнаружено, что после 16 часов затемнения в листьях накапливаются три формы протохлорофиллида, характеризующиеся такими же спектральными параметрами, что и формы в этиолированных листьях. Наблюдались максимумы

флуоресценции при 633 нм (основной максимум в синей области спектра возбуждения – 440 нм), 642 нм (444 нм) и 655 нм (448 нм). Основной фотоактивной формой оказалась форма Пхлд 655/650 (448 нм). Полоса при 642 нм исчезала очень медленно и с низким квантовым выходом (не исключено, что это уменьшение полосы при 642 нм связано не с фотовосстановлением протохлорофиллида, а с фотодеструкцией пигмента. Памятуя о роли протохлорофиллида Пхлд 653/648(440) (коротковолнового компонента основной активной формы протохлорофиллида) как предшественника хлорофилла *a* реакционных центров второй фотосистемы в ювенильных этиолированных листьях (см. предыдущий раздел), авторы провели эксперимент с монохроматическим освещением затемненных зеленых листьев ячменя по той же схеме, что в опытах с этиолированными листьями (измерение спектров флуоресценции затемненных листьев при последовательном освещении светом: 650 нм → 680 нм → 650 нм. Было обнаружено, что в зеленых листьях, так же, как в молодых этиолированных, в биосинтез хлорофилла *a*, включается форма предшественника Пхлд 653/648(440), которая в свою очередь является продуктом фотохимической реакции еще более длинноволновой формы протохлорофиллида с максимумом поглощения около 680 нм. Авторы полагают, что в зеленых листьях, также как в этиолированных, осуществяются два пути биосинтеза хлорофилла:

1. Пхлд 686/676 $\xrightarrow{h\nu}$ Хлд;
2. Пхлд 686/676(440) $\xrightarrow{h\nu}$ Пхлд 653/648(440) \longrightarrow Хлд.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно заключить, что в процессе фотобиосинтеза хлорофилла из его предшественника протохлорофиллида обнаруживаются параллельные пути превращения различных форм протохлорофиллида в зависимости от длины волны действующего света. Использование красного света позволило обнаружить путь раннего образования пигмента Р-680 реакционного центра ФС2, предшественником которого является длинноволновая форма протохлорофиллида. В связи с этим можно предположить, что причиной различия спектральных характеристик первичных флуоресцирующих форм Хлд 695/684 и Хлд 684/676 в зависимости от спектрального состава действующего света (см. раздел IV) также является преимущественное поглощение красного света минорными длин-

новолновыми формами протохлорофиллида с дальнейшей их дезагрегацией до Пхлд 653/648, превращающейся под действием света в Хлд 684/676, то есть наблюдается параллельный путь биосинтеза Пхлд 684/676 (реакции 11, 12 на общей схеме). При использовании синего и белого света эта реакция не выявляется на фоне более эффективной реакции превращения Пхлд 655/650 через форму Хлд 695/684 (на схеме не показана) в Хлд 684/676 (реакции 1, 2 на схеме) с дальнейшим образованием форм хлорофилла светособирающих комплексов.

Различия в последовательности первичных реакций биосинтеза хлорофилла на начальных стадиях зеленения, зависящие от спектрального состава действующего света, могут быть объяснены участием различных спектральных форм протохлорофиллида в реакциях биосинтеза хлорофиллов реакционного центра и хлорофилла антенны.

Кроме того, использование красного света позволило показать, что во взрослых зеленых листьях растений после их затемнения фотобиосинтез хлорофилла осуществляется через те же активные формы протохлорофиллида, что и в этиолированном листе, а пути их превращения аналогичны наблюдаемым в зеленеющих этиолированных листьях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kahn, A., Boardman, N.K., Thorn S.W. (1970) Energy transfer between protochlorophyllide molecules: evidence for multiple chromophores in the photoactive protochlorophyllide-protein complex in vivo and in vitro, *J. Mol. Biol.*, **48**, 85–101.
2. Dujardin, E., and Sironval, C. (1970) The reduction of protochlorophyllide into chlorophyllide. III. The phototransformability of the protochlorophyllide lipoprotein complex found in darkness, *Photosynthetica*, **4**, 129–138.
3. Gassman, M.L. (1973) The conversion of photoinactive protochlorophyll(ide)₆₃₃ to phototransformable protochlorophyll(ide)₆₅₀ in etiolated bean leaves, treated with δ -aminolevulinic acid, *Plant Physiol.*, **52**, 590–594.
4. Virgin, H.I. (1975) In vivo absorption spectra of protochlorophyll₆₅₀ and protochlorophyll₆₃₆ within the region 530–700 nm, *Photosynthetica*, **9**, 84–92.
5. Литвин Ф.Ф., Стадничук И.Н. (1980) Длинноволновые предшественники хлорофилла в этиолированных листьях и система нативных форм протохлорофилла. *Физиол. Раст.*, **27**, 1024–1032.
6. Boddi, B., Lindsten, A., Ryberg, M., and Sundqvist, C. (1989) On the aggregational states of protochlorophyllide and its protein complexes in wheat etioplasts, *Physiol. Plant.*, **76**, 135–143.
7. Boddi, B., Ryberg, M., Sundqvist, C. (1992) Identification of four universal protochlorophyllide forms in dark-grown leaves by analyses of the 77 K fluorescence emission spectra, *J. Photochem. Photobiol.*, **12**, 389–401.

8. Boddi, B., and Franck, F. (1997) Room temperature fluorescence spectra of protochlorophyllide and chlorophyllide forms in etiolated bean leaves, *J. Photochem. Photobiol. B.: Biol.*, **41**, 73–82.
9. Schoefs, B., Bertrand, M., Franck, F. (2000) Spectroscopic properties of protochlorophyllide analyzed *in situ* in the course of etiolation and in illuminated leaves, *Photochem. Photobiol.*, **72**, 85–93.
10. Stadnichuk, I.N., Amirjani, M.R., and Sundqvist, C. (2005) Identification of spectral forms of protochlorophyllide in the region 670–730 nm, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **4**, 230–238.
11. Беляева О.Б., Литвин Ф.Ф. Фотобиосинтез хлорофилла. (1989) М.: Изд. МГУ, 102 с.
12. Беляева О.Б. Светозависимый биосинтез хлорофилла. (2009) М.: «БИНОМ», 232 с.
13. Беляева О.Б., Литвин Ф.Ф. (2009) Пути образования пигментных форм на заключительной фотохимической стадии биосинтеза хлорофилла, *Успехи биологической химии*, **49**, 319–340.
14. Беляева О.Б., Литвин Ф.Ф. (2014) О механизмах фотопревращения протохлорофиллида в хлорофиллид, *Биохимия*, **79** (4), 431–444.
15. Ignatov, N.V., Litvin, F.F. (1996) Photoconversion of long-wavelength protochlorophyll native form Pchl 682/672 into chlorophyll Chl 715/696 in *Chlorella vulgaris* B-15, *Photosynth. Res.*, **50**, 271–283.
16. Schoefs, B., and Franck, F. (2008) The photoenzymatic cycle of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase in primary bean leaves (*Phaseolus vulgaris*) during the first days of photoperiodic growth, *Photosynth. Res.*, **96**, 15–26.
17. Беляева О.Б., Литвин Ф.Ф. (2007) Фотоактивные пигмент-ферментные комплексы предшественника хлорофилла, *Успехи биологической химии*, **47**, 189–232.
18. Рубин А.Б., Минченкова Л.Е., Красновский А.А., Тумерман Л.А. (1962) Исследование длительности флуоресценции протохлорофиллида при зеленении этиолированных листьев, *Биофизика*, **7**, 571–577.
19. Goedheer, J., Verhulsdonk, C. (1970) Fluorescence and phototransformation of protochlorophyll with etiolated bean leaves from –196°C to +20°C, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 260–266.
20. Sironval, C., Kuypers, P. (1972) The reduction of protochlorophyllide into chlorophyllide: IV. The nature of the intermediate P₆₈₈₋₆₇₆ species, *Photosynthetica*, **6**, 254–275.
21. Раскин В.И. (1976) Механизм фотовосстановления протохлорофиллида в интактных этиолированных листьях, *Вестн. Акад. Наук БССР*, № 5, 43–46.
22. Dujardin, E., and Correia, M. (1979) Long-wavelength absorbing pigment protein complexes as fluorescence quenchers in etiolated leaves illuminated in liquid nitrogen, *Photobiophys. Photobiophys.*, **1**, 25–32.
23. Correia, M., and Dujardin, E. (1983) Kinetics of the action of intrinsic fluorescence quenchers in etiolated, greening and green leaves illuminated at 77 K, *Photobiophys. Photobiophys.*, **5**, 281–292.
24. Dujardin, E. (1984) The long-wavelength absorbing quenchers formed during illumination of protochlorophyllide-proteins. In: Protochlorophyllide Reduction and Greening / C. Sironval and M. Brouers Eds., Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publisher, The Hague, 87–98.
25. Лосев А.П. и Лялькова Н.Д. (1979) Исследование начальных стадий фотогидрирования протохлорофиллида в этиолированных

- растениях, *Молекулярная биология*, **13**, 837–844.
26. Литвин Ф.Ф., Игнатов Н.В. (1980) Обратимость превращения протохлорофиллида в хлорофиллид в этилированных листьях растений под действием света, *Докл. АН СССР*, **250**, 1463–1465.
 27. Беляева О.Б. и Литвин Ф.Ф. (1980) О новых промежуточных реакциях в процессе фотовосстановления протохлорофиллида, *Биофизика*, **25**, 617–623.
 28. Belyaeva, O.B., Litvin, F.F. (1981) Primary reactions of protochlorophyllide into chlorophyllide photo-transformation at 77 K, *Photosynthetic*, **15**, 210–215.
 29. Litvin, F.F., Ignatov, N.V., Belyaeva, O.B. (1981) Photoreversibility of transformation of protochlorophyllide into chlorophyllide, *Photobiochem. Photobiophys.*, **2**, 233–237.
 30. Belyaeva, O.B., Personova, E.R., Litvin, F.F. (1983) Photochemical reaction of chlorophyll biosynthesis at 4,2 K, *Photosynth. Research*, **4**, 81–85.
 31. Frank, F., Dujardin, E., Sironval, C. (1980) Non-fluorescent, short-lived intermediate in photoenzymatic protochlorophyllide reduction at room temperature, *Plant. Sci. Lett.*, **18**, 375–380
 32. Franck, F., Mathis, P. (1980) A short-lived intermediate in the photoenzymatic reduction of protochlorophyll(ide) into chlorophyll(ide) at a physiological temperature, *Photochem. Photobiol.*, **32**, 799–803.
 33. Inoue, Y., Kobayashi, T., Ogawa, T., Shibata, K. (1981) A short intermediate in the photoconversion of protochlorophyllide to chlorophyllide *a*, *Plant Cell Physiol.*, **22**, 197–204.
 34. Iwai, J., Ikeuchi, M., Inoue, Y., Kobayashi, T. (1984) Early processes of protochlorophyllide photoreduction as measured by nanosecond and picosecond spectrophotometry. In: Protochlorophyllide Reduction and Greening / C., Sironval and M., Brouers Eds., Martinus Nijhoff/Dr.W Junk Publisher. The Hague, 99–112.
 35. Беляева О.Б., Тимофеев К.Н., Литвин Ф.Ф. (1987) Исследование природы промежуточных продуктов фотовосстановления протохлорофилла(ида) *in vitro* и *in vivo* методами оптической и ЭПР-спектроскопии, *Биофизика*, **32**, 104–109.
 36. Belyaeva, O.B., Timofeev, K.N., Litvin, F.F. (1988) The primary reaction in the protochlorophyll(ide) photoreduction as investigated by optical and ESR-spectroscopy, *Photosynth. Research.*, **15**, 247–256.
 37. Ignatov, N.V., Belyaeva, O.B., Litvin, F.F. (1993) Low temperature phototransformation of protochlorophyll(ide) in etiolated leaves, *Photosynthesis Research*, **38**, 117–124.
 38. Lebedev, N.N., Timko, M. (1999) Protochlorophyllide oxidoreductase B-catalyzed protochlorophyllide photoreduction *in vitro*: Insight into the mechanism of chlorophyll formation in light-adapted plant, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 17954–17959.
 39. Беляева О.Б., Гриффитс В.Т., Ковалев Ю.В., Тимофеев К.Н., Литвин Ф.Ф. (2001) Участие свободных радикалов в фотовосстановлении протохлорофиллида до хлорофиллида в искусственных пигмент-белковых комплексах, *Биохимия*, **66**, 173–177.
 40. Heyes, D.J., Ruban, A.V., Wilks, H.M., Hunter, C.N. (2002) Enzymology below 200 K: The kinetics and thermodynamics of the photochemistry catalyzed by protochlorophyllide oxidoreductase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 11145–11150.
 41. Heyes, D.J., Ruban, A.V., Hunter, C.N. (2003) Protochlorophyllide oxi-

- doreductase: «Dark» reaction of a light-driven enzyme, *Biochemistry*, **42**, 523–528.
42. Heyes, D.J., Hunter, C.N., van Stokkum, I.H.M., Grondelle, R., Groot, M.L. (2003) Ultrafast enzymatic reaction dynamics in protochlorophyllide oxidoreductase, *Nature Structural Biology*, **10**, 491–492.
43. Heyes, D.J., Heathcote, P., Rigby, S.E.J., Palacios, M.A., Grondelle, R., Hunter, C.N. (2006) The first catalytic step of the light-driven enzyme protochlorophyllide oxidoreductase proceeds via a charge transfer complex, *J. Biol. Chem.*, **281**, 26847–26853.
44. Sytina, O.A., Heyes, D.J., Hunter, C.N., Alexandre, M.T., van Stokkum, I.H.M., van Grondelle, R., Groot, M.L. (2008) Conformational changes in an ultrafast light-driven enzyme determine catalytic activity, *Nature*, **456**, 1001–1005.
45. Беляева О.Б. (1994) Заключительные стадии биосинтеза хлорофилла в листьях растений: Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биол. наук. Пущино: Институт почвоведения и фотосинтеза РАН, 45 с.
46. Raskin, V.I., Schwartz, A. (2002) The charge-transfer complex between protochlorophyllide and NADPH: an intermediate in protochlorophyllide photoreduction, *Photosynth. Res.*, **74**, 181–186.
47. Griffiths, W.T., McHugh, T., Blankenship, R.E. (1996) The light intensity dependence of protochlorophyllide photoreduction and its significance to the catalytic mechanism of protochlorophyllide reductase, *FEBS Lett.*, **398**, 235–238.
48. Belyaeva, O.B., Sundqvist, C. (1998) Comparative investigation of the appearance of primary chlorophyllide forms in etiolated leaves, prolamellar bodies and prothylakoids, *Photosynth. Research.*, **55**, 41–48.
49. Dobek, A., Dujardin, E., Franck, F., Sironval, C., Breton, J., Roux, E. (1981) The first events of protochlorophyll(ide) photoreduction investigated in etiolated leaves by means of the fluorescence excited by short, 610 nm laser flashes at room temperature, *Photobiochem. Photobiophys.*, **2**, 35–44.
50. Ignatov, N.V., Litvin, F.F. (2002) A new pathway of chlorophyll biosynthesis from long-wavelength protochlorophyllide Pchl_{686/676} in juvenile etiolated plants, *Photosynth. Res.*, **71**, 195–207.
51. Schoefs, B., and Franck, F. (1993) Photoreduction of protochlorophyllide to chlorophyllide in 2-d-old dark-grown bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Comodore) leaves. Comparison with 10-d-old dark-grown (etiolated) leaves, *J. Exp. Bot.*, **44**, 1053–1057.
52. Franck, F., and Strzalka, K. (1992) Detection of the photoactive protochlorophyllide-protein complex in the light during the greening of barley, *FEBS Lett.*, **309**, 73–77.
53. Belyaeva, O.B., Böddi, B., Ignatov, N.V., Lang, F., and Litvin, F.F. (1984) The role of a long-wavelength pigment forms in the chlorophyll biosynthesis, *Photosynth. Res.* **5**, 263–271.
54. Игнатов Н.В., Беляева О.Б. и Литвин Ф.Ф. (1983) Сенсibilизация фотохимической стадии образования хлорофилла длинноволновыми формами протохлорофилла(ида) и хлорофиллидом при лазерном облучении, *Докл. АН СССР*, **273**, 737–740.
55. Литвин Ф.Ф., Красновский А.А., и Рихирева Г.Т. (1959) Образование и превращение протохлорофилла в зеленых листьях растений, *Докл. АН СССР*, **127**, 699–701.
56. Garab, G.T., Sundqvist, C., and Faludi-Daniel, A. (1980) Detection of protochlorophyllide forms in green leaves, *Photochem. Photobiol.*, **31**, 491–503.

57. Лебедев Н.Н., Шиффел П. и Красновский А.А. (1985) Спектральные характеристики флуоресценции протохлорофиллида и хлорофилла в зеленых листьях и изолированных хлоропластах, *Биофизика*, **30**, 44–49.
58. Игнатов Н.В. и Литвин Ф.Ф. (2002) Биосинтез хлорофилла из протохлорофилл(ида) в зеленых листьях растений, *Биохимия*, **67**, 1142–1150.