

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

А. А. ГУРЕВИЧ

**О ВОССТАНОВЛЕНИИ ОРТО-ДИНИТРОБЕНЗОЛА НА СВЕТУ  
ХЛОРОПЛАСТАМИ ВНЕ КЛЕТКИ**

(Представлено академиком А. А. Рихтером 8 VIII 1946)

Ранее мы пришли к заключению (1, 2), что восстановление орто-динитробензола в орто-нитранилин в зеленых листьях на свету представляет собой результат фотохимического действия света, осуществляемого при участии зеленых пластид и что это восстановление непосредственно связано с фотохимическим процессом в хлоропластах, совершаясь в них независимо от ассимиляции углекислоты. Это заключение основано на том, что восстановление орто-динитробензола под воздействием света имеет место только в зеленых частях растения и происходит с одинаковой интенсивностью в нормальной атмосфере и в среде, лишенной углекислоты.

При освобождении внешней среды от углекислоты все же не представляется возможным полностью удалить последнюю из сферы деятельности хлоропластов, так как она образуется при дыхании. Поэтому при такой постановке опыта не удастся совершенно приостановить ассимиляцию углекислоты, и возможность некоторого влияния данного процесса на восстановление орто-динитробензола в зеленых клетках на свету не вполне исключается. Исходя из этого, возможность восстановления орто-динитробензола в зеленом растении под воздействием света независимо от ассимиляции углекислоты была исследована также и другим путем.

Впервые Engelmann (3) показал, что изолированные из клетки хлоропласты продолжают на свету выделять кислород. Эти данные были затем подтверждены другими исследователями (4-6). Упомянутые авторы, наблюдая образование кислорода освещенными хлоропластами вне клетки, полагали, что этот процесс сопряжен с восстановлением углекислоты и представляет собой, таким образом, проявление нормального фотосинтеза зеленых растений.

Другие авторы (7-9) подвергли весьма тщательному исследованию образование молекулярного кислорода освещенными хлоропластами вне клетки в присутствии оксалата железа и некоторых других его солей. При этом железо подвергается восстановлению, переходя из трехвалентной в двухвалентную форму в количестве, соответствующем выделенному кислороду. Напротив, в присутствии углекислоты (без солей железа) выделение кислорода на свету изолированными зелеными пластидами не имеет места.

Таким образом, образование молекулярного кислорода и восстановление углекислоты, тесно связанные между собой в процессе фотосинтеза зеленых растений, были экспериментально друг от друга отделены. Вместе с тем было показано, что изолированные из клетки хлоро-

пласты, выделяя под воздействием света кислород, не обладают способностью подвергаться восстановлению углекислоту.

Описанные ниже опыты были проведены с зелеными пластидами листьев примулы (*Primula*), мокрицы (*Stellaria media*) и лебеды (*Atriplex*). Мокрица была выбрана потому, что она является главным объектом в исследованиях Hill и Scarisbrick (8, 9). При извлечении хлоропластов из паренхимной ткани листа и приготовлении суспензии из них была также использована методика, принятая этими авторами, с незначительными изменениями.

Для каждого опыта бралось 2 г свежих листьев, непосредственно перед этим снятых с растения и обмытых водопроводной водой. Затем листья мелко нарезались ножницами и растирались в ступке в продолжение 1 мин. с 7 мл водной среды, служащей для суспендирования зеленых пластид. После этого темнозеленая жидкость, содержащая взвешенные хлоропласты, фильтровалась через воронку со стеклянной ватой для освобождения ее от остатков растертой растительной ткани. Микроскопические наблюдения этого фильтрата показали присутствие в нем большого количества зеленых пластид. Целых клеток или их частей не было обнаружено.

Приготовленной таким образом суспензией хлоропластов наполнялись две кюветки с плоскопараллельными стенками из зеркального стекла, емкостью в 3 мл каждая, в которые вносился также орто-динитробензол. Одна кюветка подвергалась освещению, другая же затемнялась при помощи футляра из плотной черной бумаги и служила контролем. Источником света служила электролампа в 300 W, расположенная на расстоянии 8 см от кюветок с суспензией хлоропластов. Для защиты от нагревания кюветок между ними и электролампой помещался стеклянный сосуд с плоскопараллельными стенками, наполненный водой. Продолжительность опытов составляла 1 час, за исключением лишь некоторых опытов, которые продолжались 2—3 часа. Температура при опытах не выходила за пределы от 20 до 30° C, повышаясь в течение опыта на несколько градусов.

После опыта суспензии хлоропластов — опытная и контрольная — испытывались посредством известных качественных цветных реакций на присутствие в них продуктов восстановления орто-динитробензола — орто-нитрофенилгидроксиламина и орто-нитранилина. Орто-нитрофенилгидроксиламин обнаруживался путем добавления капли раствора аммиака (фиолетовое окрашивание), а орто-нитранилин — при помощи диазореакции с  $\alpha$ -нафтолом (красное окрашивание). Зеленая окраска раствора не препятствовала проявлению этих реакций.

Уже в первых опытах обнаружилась высокая чувствительность изолированных зеленых пластид по отношению к орто-динитробензолу или к продуктам его восстановления и в связи с этим неустойчивость их результатов. Испытания показали, что постоянство результатов обеспечивается при внесении орто-динитробензола в суспензию хлоропластов в виде «динитробензольной бумажки», т. е. фильтровальной бумаги, пропитанной 5—10% раствором орто-динитробензола в этиловом эфире и затем высушенной на воздухе. Полоска «динитробензольной бумажки», соответствующая по размерам широкой стенке кюветки, вводится в последнюю до наполнения ее суспензией зеленых пластид и располагается по стенке, противолежащей источнику света. Так достигается равномерное и вместе с тем не слишком медленное увеличение концентрации орто-динитробензола в суспензии хлоропластов.

Для опытов с хлоропластами, изолированными из листьев примулы и мокрицы, были использованы в качестве среды для приготовления суспензии водопроводная вода и 10, 15 и 20% растворы сахарозы в

водопроводной воде и в  $1/30$  мол. фосфатной буферной смеси,  $\text{pH} = 8$ . Опыты с хлоропластами из листьев лебеды были поставлены только с водопроводной водой.

Проведенные опыты показали образование продуктов восстановления орто-динитробензола на свету изолированными из клетки хлоропластами испытанных растений при применении вышеуказанных сред для их суспендирования. Реакция на орто-нитрофенилгидроксиламин была умеренно сильной; реакция на орто-нитранилин была у примулы едва заметной, а у мокрицы слабой, но хорошо заметной. Различия в силе реакций при различных использованных нами для суспендирования зеленых пластид средах не было обнаружено.

В темноте восстановление орто-динитробензола изолированными хлоропластами не имело места. Только в некоторых опытах большой продолжительности (3 часа) было обнаружено очень слабое образование ортонитрофенилгидроксиламина также в темноте, причем значительно меньшее, чем на свету. Это обусловлено, вероятно, обычным темновым восстановлением орто-динитробензола, вызванным недостатком кислорода в суспензии зеленых пластид (1).

Как уже было указано, при восстановлении орто-динитробензола на свету изолированными из клеток хлоропластами происходит преимущественно образование первого продукта его восстановления — орто-нитрофенилгидроксиламина — и лишь в незначительной степени образуется продукт его дальнейшего восстановления — орто-нитранилин. Между тем, в освещенных зеленых листьях восстановление орто-динитробензола совершается, как это уже ранее нами было отмечено, полностью до конца с накоплением орто-нитранилина. Это различие в интенсивности восстановления орто-динитробензола на свету — изолированными хлоропластами и живыми клетками — находит свое объяснение в том, что фотохимическая активность зеленых пластид вне клетки, как известно, сильно понижена.

Опыты, аналогичные вышеизложенным, были проведены также с бесцветными, слабо опалесцирующими вытяжками, полученными из растертой паренхимной ткани клубня картофеля. В этих опытах, продолжительностью 1 час, как на свету, так и в темноте, восстановление орто-динитробензола не имело места.

Таким образом, описанные выше опыты показывают, что под воздействием света изолированные из клетки хлоропласты подвергают орто-динитробензол восстановлению в последовательности:



Между тем, исследованиями Hill и Scarisbrick установлено, что зеленые пластиды вне клетки, обладая ограниченной фотохимической активностью, не способны к восстановлению углекислоты. Отсюда следует, что восстановление орто-динитробензола на свету изолированными хлоропластами совершается независимо от восстановления в них углекислоты.

Мы видим, следовательно, что фотохимическая работа зеленых пластид не ограничена восстановлением только углекислоты; их функция не строго специфична: хлоропласты обладают способностью при участии световой энергии подвергаться восстановлению и такие, резко отличные по своему химическому строению от углекислоты вещества, как орто-динитробензол и, согласно данным Hill и Scarisbrick, оксалат железа.

Восстановление орто-динитробензола в орто-нитрофенилгидроксиламин сопряжено с присоединением водорода. Орто-динитробензол представляет собой акцептор водорода и поэтому может служить индикатором

тором на активированный водород при исследовании биохимических процессов.

Опыты по восстановлению орто-динитробензола на свету изолированными хлоропластами показывают, что в последних под воздействием света возникает активированный водород. Из того, что хлоропласты вне клетки утрачивают способность к восстановлению углекислоты, следует, что продукты ее ассимиляции не могли в данном случае служить донатором водорода. Остается, следовательно, признать, что образование активированного водорода в хлоропластах на свету непосредственно связано с совершающимся в них фотохимическим процессом.

Как уже было указано выше, освещенные зеленые пластиды вне клетки выделяют молекулярный кислород в присутствии соответствующего акцептора водорода. Согласно последним исследованиям, выполненным с помощью изотопного метода (<sup>10</sup>, <sup>11</sup>), источником этого молекулярного кислорода служит вода. Отсюда можно сделать вывод, что вода представляет собой также донатор активированного водорода, образующегося в результате ее фотолиза в хлоропластах на свету.

Таким образом, исследование восстановления орто-динитробензола на свету изолированными из клетки хлоропластами приводит к подтверждению ранее сделанного нами заключения об участии активированного водорода и воды, как его донатора, в процессе фотосинтеза зеленых растений (<sup>2</sup>). Это заключение находится в полном соответствии с современными теоретическими представлениями о механизме фотосинтеза (<sup>12</sup>).

Сельскохозяйственная академия  
им. К. А. Тимирязева,  
Москва

Поступило  
8 VIII 1946

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> А. А. Гуревич, Биохимия, 6, 467 (1941). <sup>2</sup> А. А. Гуревич, ДАН, 47, 672 (1945). <sup>3</sup> Th. W. Engelmann, Bot. Z., 39, 441 (1881). <sup>4</sup> G. Haberlandt, Ueber die Beziehungen zwischen Funktion und Lage des Zellkernes bei den Pflanzen, Jena, 1887. <sup>5</sup> M. W. Beijerinck, Koninkl. Akad. Wetensch. Amsterdam (1901). <sup>6</sup> H. Molisch, Bot. Z., 62, 1 (1904). <sup>7</sup> R. Hill, Proc. Roy. Soc. London, B, 127, 192 (1939). <sup>8</sup> R. Hill and R. Scarisbrick, Proc. Roy. Soc. London, B, 129, 238 (1940). <sup>9</sup> R. Hill and R. Scarisbrick, Nature, 146, 61 (1940). <sup>10</sup> S. Ruben, M. Randall, M. Kamen and J. L. Hyde, J. Am. Chem. Soc., 63, 877 (1941). <sup>11</sup> А. П. Виноградов и Р. В. Тейс, ДАН, 33, 497 (1941). <sup>12</sup> E. J. Rabinowitch, Photosynthesis and Related Processes, 1, N. Y., 1945.