

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Т. Ф. АНДРЕЕВА и Л. Е. ЗУБКОВИЧ

**О ФОТОХИМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИЗОЛИРОВАННЫХ ГРАНУЛ
ХЛОРОПЛАСТОВ**

(Представлено академиком Н. А. Максимовым 9 III 1948)

В изучении механизма фотосинтеза за последние годы большое значение приобретают работы с изолированными хлоропластами. Е. А. Бойченко (1-4) удалось наблюдать на свету в условиях подходящего pH, создаваемого определенной концентрацией сахаров, длительное выделение водорода изолированными хлоропластами. Работами Hill (5,6), Warburg (7), А. А. Гуревича (8) установлена способность изолированных хлоропластов и гранул восстанавливать на свету целый ряд окислителей (таких, как соли трехвалентного железа, хинон, ортодинитробензол) с выделением кислорода.

В основе этих реакций с изолированными хлоропластами на свету лежит их способность осуществлять фотохимическое окисление воды. Имеющиеся в литературе данные (5,6,9) указывают на общность этих реакций с фотохимическими реакциями процесса фотосинтеза. Это положение подтверждается работой French и Rabideau (10), показавшей близкие значения квантовых выходов фотосинтеза и фотохимического восстановления Fe^{+++} , осуществляемого хлоропластами.

Возможность осуществления части реакций фотосинтеза на более простой, чем лист, системе — в суспензии изолированных хлоропластов и гранул — открывает новые пути в изучении механизма фотосинтеза. В связи с этим нами было начато изучение фотохимической активности изолированных гранул.

Для определения фотохимической активности изолированных гранул была использована реакция Варбурга (7), применявшего в качестве окислителя хинон: $2 \text{хинон} + 2\text{H}_2\text{O} = 2 \text{гидрохинон} + \text{O}_2$. Учитывался выделяющийся в результате реакции кислород.

При изготовлении суспензии гранул мы руководствовались методами Neish (11) и Warburg (7). Все операции по изготовлению суспензии проводились в посуде, охлаждаемой льдом. Опытные листья снимались в 9 час. утра с растений и тщательно промывались водопроводной водой. Навеска листьев в 40—50 г растиралась в небольшом количестве дистиллированной воды в фарфоровой ступке. Растертая листовая масса отжималась через полотно и центрифугировалась в течение 5 мин. со скоростью 1000 оборотов в минуту для отделения неповрежденных клеток, крахмала и нерастворимых солей. К полученной суспензии, для более полного осаждения гранул, добавлялся CaCl_2 так, что концентрация его в суспензии равнялась 0,1 М. По истечении 30 мин., когда полной флокуляции гранул обычно еще не наблюдалось, суспензия центрифугировалась в течение 10 мин. для осаждения гранул и отделения их от плазмы и клеточного сока. Осадок гранул дважды промывался дистиллированной водой (в 200 см³)

с помощью центрифугирования, после чего ресуспендировался в нескольких кубических сантиметрах (8—10) фосфатного буфера с $\text{pH}=6,5$.

Полученная таким образом суспензия шла непосредственно на определение фотохимической активности гранул. В 1 см^3 суспензии обычно содержалось около 1 мг хлорофилла. Выделяющийся суспензией в результате реакции кислород определялся манометрически на приборе Варбурга. Суспензия освещалась 200-ваттными лампами, дававшими на поверхности опытных сосудиков освещенность около 11 000 люкс. Определения проводились при 20°C . В основную часть опытного сосудика помещался 1 см^3 суспензии, к которой после установления температурного равновесия из боковой реторточки прибавлялось $0,4 \text{ см}^3 1\%$ раствора хинона в $0,01 \text{ M H}_2\text{SO}_4$. В центральный стаканчик каждого сосудика помещалось $0,5 \text{ см}^3 5\%$ NaOH для поглощения небольших количеств CO_2 , выделявшихся из суспензии.

Предварительно проведенные опыты подтвердили указания⁽⁵⁾ о том, что промытые гранулы в значительной степени теряют свою фотохимическую активность и приобретают ее вновь в присутствии таких анионов, как Cl^- , Br^- , I^- и NO_3^- . Поэтому к суспензии гранул мы прибавляли раствор KCl (создававший концентрацию KCl в суспензии $0,05\%$), благодаря чему фотохимическая активность увеличивалась в 1,5—2 раза.

Определения проводились в аэробных условиях; в связи с этим наблюдалось значительное потребление кислорода суспензией. Это поглощение кислорода (отрицательное давление на манометрах) было одинаковым у суспензии с хиноном и без хинона в темноте и усиливалось на свету. Для учета отрицательного давления ставился контроль—суспензия без хинона на свету. Величина реакции определялась как сумма данных поглощения и выделения кислорода (положительного и отрицательного давления).

Параллельно с изучением фотохимической активности изолированных гранул мы проводили определения интенсивности фотосинтеза листьев, служащих для изготовления суспензии. Интенсивность фотосинтеза определялась на приборе Варбурга (интенсивность освещения 11 000 люкс в опытах 20 VIII—1 IX и 16 000 люкс в остальных опытах). Нам удалось обнаружить выделение кислорода на свету в присутствии хинона гранулами, изолированными из целого ряда растений: шпината (*Spinacia oleracea*), примулы (*Primula obconica*), конских бобов (*Vicia faba*), фасоли (*Phaseolus vulgaris*), табака (*Nicotiana tabacum*) и сахарной свеклы (*Beta vulgaris*). Наиболее детально фотохимическая активность была изучена на суспензии гранул из листьев фасоли, выращиваемой в открытом грунте.

Как показывают приведенные в табл. 1 данные, изолированные гранулы во всех опытах обнаруживают значительную фотохимическую активность, достигающую до $251 \text{ мм}^3 \text{ O}_2$ в час на 1 мг хлорофилла. Скорость этого процесса, наблюдавшегося нами в течение часа, давала наибольшие показатели за первые 30 мин. и к концу определения падала на 30—40% по сравнению с первоначальной. Аналогичные данные о величине фотохимической активности суспензии гранул и ее устойчивости в течение времени получены нами также на всех вышеупомянутых объектах.

Сопоставляя полученные данные (табл. 1), мы видим, что параллелизма в изменениях фотохимической активности изолированных гранул и интенсивности фотосинтеза листа не наблюдается. Так например, при сравнительно небольших колебаниях интенсивности фотосинтеза у молодых и у старых листьев фотохимическая активность изолированных гранул молодых листьев в 2—3 раза ниже фотохимической активности гранул старых листьев трехмесячной фасоли (опыты 20 VIII—1 IX). При значительном сни-

Таблица I

Дата опыта	Объект	Фотохимическая активность суспензии гранул в мм ³ O ₂ в час на 1 мг хлорофилла			Фотосинтез в мг CO ₂ в час на 1 дц ²
		суспензия + хинон на свету	суспензия без хинона на свету	сумма	
20 VIII	Фасоль 10-дневная (1-я пара листьев)	+8,9	-34,7	43,8	8,0
21 VIII	Фасоль 11-дневная (1-я пара листьев)	+21,5	-28,8	50,3	14,6
22 VIII	Фасоль 12-дневная (1-я пара листьев)	+38,8	-27,8	66,6	8,7
27 VIII	Фасоль 3-месячная (старые листья)	+66,7	-94,0	160,7	11,0
28 VIII	То же	+24,8	-61,2	86,0*	8,2
29 VIII	» »	+64,4	-76,8	141,2**	6,7
1 IX	» »	+84,5	-85,4	169,9	11,0
17 IX	Фасоль 37-дневная (листья 1-го яруса снизу)	+30,3	-33,4	63,7	6,9
	Фасоль 37-дневная (5-дневные листья верхнего яруса)	+34,5	-27,1	61,6	9,8
20 IX ***	Фасоль 40-дневная (листья 1-го яруса снизу)	+43,1	-22,5	65,6	10,3
	Фасоль 40-дневная (5-дневные листья верхнего яруса)	+27,8	-13,5	41,3	2,7
23 IX ***	Фасоль 43-дневная (листья 1-го яруса снизу)	+95,2	-62,1	157,3	10,3
	Фасоль 43-дневная (5-дневные листья верхнего яруса)	+70,1	-52,3	122,4	5,1
25 IX ***	Фасоль 45-дневная (листья 1-го яруса снизу)	+78,0	-70,4	148,4	10,2
	Фасоль 45-дневная (5-дневные листья верхнего яруса)	+55,3	-60,9	116,2	5,3
26 IX	Фасоль 46-дневная (листья 2-го яруса снизу)	+106,5	-144,7	251,2	7,2
	Фасоль 46-дневная (5-дневные листья верхнего яруса)	+109,1	-78,8	187,9	9,4
29 IX	Фасоль 47-дневная (листья 2-го яруса снизу)	+156,3	-79,8	236,1	7,9
	Фасоль 47-дневная (5-дневные листья верхнего яруса)	+72,2	-49,5	121,7	9,4

* Перед опытом пасмурно, дождь.

** Перед опытом пасмурно, дождь. Листья до изготовления суспензии освещались в лаборатории светом 1000-ваттной лампы.

*** Ночные заморозки.

жении интенсивности фотосинтеза молодых листьев верхнего яруса в результате ночных заморозков (опыты 20—25 IX) по сравнению с данными опыта от 17 IX не наблюдалось снижения фотохимической активности изолированных гранул, а наоборот, происходило ее увеличение (опыты 23 и 25 IX). Подъем фотохимической активности гранул старых листьев нижнего яруса (опыты 26—29 IX) не сопровождался повышением интенсивности фотосинтеза.

Изложенный материал позволяет нам также сделать вывод о зависимости фотохимической активности изолированных гранул от возрастного состояния листа. Как уже указывалось выше, гранулы старых листьев трехмесячной фасоли обнаруживают в 2—3 раза более высокую фотохимическую активность, чем гранулы молодой фасоли. Это явление имеет место также и для гранул, выделенных из листьев, менее резко отличающихся по возрасту (листья разных ярусов на одном растении, опыты 17—29 IX), однако в этом случае различия фотохимической активности гранул у разновозрастных листьев выражены значительно слабее (17 IX они вообще отсутствовали).

В процессе работы с изолированными гранулами нам пришлось убедиться в том, что условия внешней среды (освещение, температура), в которых находятся опытные растения, могут оказывать большое влияние на величину фотохимической активности изолированных гранул. Так, гранулы, выделенные из листьев растений, находившихся перед опытом в течение суток в условиях пасмурной и дождливой погоды, обнаружили значительное падение фотохимической активности (опыт от 28 VIII). Предварительное освещение таких листьев (отделенных от растения и погруженных в воду) в течение 3 час. двумя 1000-ваттными лампами (на расстоянии 50 см) почти полностью восстановило утраченную величину фотохимической активности изолированных гранул (опыт от 29 VIII).

Низкие температуры, воздействующие на листья, приводят также к увеличению фотохимической активности изолированных гранул. Результаты опытов, проведенных после ночных заморозков (20—25 IX), показывают значительное увеличение фотохимической активности изолированных гранул (23, 25 IX). Это действие низких температур сказалось, повидимому, на уровне фотохимической активности изолированных гранул и в последующие дни определений, когда ночных заморозков не было (26 и 29 IX). Указанная выше зависимость фотохимической реакции от условий освещения и действия низких температур находится в согласии с данными Kutt и French (12).

Обобщая все вышесказанное, можно сделать следующие выводы.

1. Реакция Варбурга является удобным методом изучения фотохимической активности изолированных гранул. Процесс выделения кислорода изолированными гранулами в присутствии хинона на свету достаточно устойчив и обнаруживает значительную интенсивность.

2. Наблюдаемые изменения в интенсивности фотосинтеза не находятся в прямой зависимости от изменений величины фотохимической активности изолированных гранул. В связи с этим можно предполагать, что в естественных условиях интенсивность фотосинтеза определяется интенсивностью темновых реакций.

3. Возрастное состояние растений влияет на величину фотохимической активности изолированных гранул. Повышение фотохимической активности у гранул старых листьев дает возможность предположить, что отмечаемое многими авторами падение интенсивности фотосинтеза в процессе онтогенеза связано не с ослаблением фотохимической активности, а со снижением интенсивности плазматических реакций.

4. Фотохимическая активность изолированных гранул находится в тесной зависимости от условий внешней среды, воздействующей на опытные растения.

Авторы выражают глубокую благодарность проф. А. А. Ничипоровичу за предоставление темы и руководство работой.

Институт физиологии растений
им. К. А. Тимирязева
Академии Наук СССР

Поступило
6 III 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Е. А. Бойченко, ДАН, 38, № 5—6 (1943). ² Е. А. Бойченко, ДАН, 42, № 8 (1944). ³ Е. А. Бойченко, ДАН, 52, № 6 (1946). ⁴ Е. А. Бойченко Биохимия, 12, в. 2 (1947). ⁵ R. Hill, Proc. Roy. Soc. Lond., B, 127, No. 847, 192 (1939). ⁶ R. Hill and R. Scarisbrick, *ibid.*, 129, No. 855 (1940). ⁷ O. Warburg и W. Lüttgens, Биохимия, 11, в. 4 (1946). ⁸ А. А. Гуревич, ДАН, 55, № 3 (1947). ⁹ C. S. French and M. L. Anson, Am. J. Bot., 28 (10), 12 (1941). ¹⁰ C. S. French and G. S. Rabideau, J. Gen. Physiology, 28, No. 4, 329 (1945). ¹¹ A. C. Neish, Bioch. J., 33, No. 3 (1939). ¹² Y. Kutt and C. S. French, Am. J. Bot., 32, No. 6, 291 (1945).