

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Л. Е. ЗУБКОВИЧ и Т. Ф. АНДРЕЕВА

**О ФОТОХИМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИЗОЛИРОВАННЫХ  
ХЛОРОПЛАСТОВ**

(Представлено академиком Н. А. Максимовым 9 V 1949)

В наших предварительных опытах было установлено, что суспензии хлоропластов, находящиеся в условиях пониженных температур (+2 — 3°), обнаруживают постепенное падение фотохимической активности (выделение кислорода в присутствии хинона), наблюдаемое в течение нескольких суток; при повышении температуры потеря активности хлоропластами протекает значительно быстрее.

С точки зрения выяснения механизма процесса фотохимического выделения кислорода изолированными хлоропластами представляло интерес установить, какие системы хлоропласта ответственны за падение активности процесса и, прежде всего, не связано ли это явление с изменением состояния хлорофилла в суспензии.

Известно, что хлорофилл в живой растительной клетке по своим оптическим свойствам (спектру поглощения, флуоресценции), светостойкости и ряду других показателей отличается от хлорофилла в растворе органических растворителей. Эти отличия в свойствах хлорофилла объясняются разным состоянием хлорофилла в листе и в растворе.

В основе современного взгляда на состояние хлорофилла в листе лежит представление (впервые высказанное М. С. Цветом<sup>(2)</sup> и В. Н. Любименко<sup>(3)</sup>) о том, что хлорофилл в естественном состоянии связан с белком хлоропласта<sup>(4-7)</sup>. Возможно, что это состояние хлорофилла не является единственной формой существования хлорофилла в живом листе<sup>(8,9)</sup>.

Нарушение естественного состояния хлорофилла, наблюдаемое в результате ряда воздействий на лист (высокая температура, ультрафиолетовые лучи), сопровождается изменением оптических свойств листа (потеря флуоресценции, сдвиг положения максимума поглощения).

Водные зеленые экстракты, получаемые при растирании листьев в воде, обладают спектральными свойствами живого листа и флуоресценцией.

Можно было предположить, что наблюдаемое в наших опытах падение фотохимической активности хлоропластов связано с изменением состояния хлорофилла в исследуемых суспензиях.

Для выяснения этого вопроса, параллельно с определениями фотохимической активности суспензий хлоропластов, инактивирующихся в процессе хранения (при +2 — 3°) и воздействием повышенных температур (+28 — 30°), мы проводили измерения спектра поглощения хлоропластов в красном участке спектра (645—685 мμ), проверку наличия флуоресценции, определения прочности связи хлорофилла с белком и концентрации хлорофилла в суспензии.

Работа проведена с суспензиями хлоропластов, полученных из листьев фасоли (*Phaseolus vulgaris*) и свеклы (*Beta vulgaris*).

Суспензии изготовлялись по ранее изложенному способу <sup>(1)</sup> с тем отличием, что осаждение хлоропластов при центрифугировании проводилось без хлористого кальция и в ряде опытов применялась суперцентрифуга с 33 000 оборотов в минуту. Следует отметить, что мы получали суспензии разрушенных хлоропластов, обнаруживающих гранулярное строение при рассмотрении под электронным микроскопом\*.

Фотохимическая активность хлоропластов (выделение кислорода в присутствии парахинона <sup>(10)</sup>) учитывалась манометрическим методом <sup>(11)</sup>. Определения проводились в атмосфере азота, содержавшего менее 0,1% кислорода.

Спектр поглощения измерялся на спектрофотометре системы Кениг-Мартенса или Бекмана\*\*, концентрация хлорофилла определялась на спектрофотометре системы Кениг-Мартенса.

Проверка флуоресценции проводилась при возбуждении ее ультрафиолетовым светом и с наблюдением через красный светофильтр. Для определения прочности связи хлорофилла с белком мы пользовались методом Т. Н. Годнева и О. П. Осиповой <sup>(11)</sup>.

Суспензия хлоропластов (1 см<sup>3</sup>) настаивалась в темноте в течение 30 мин. с 60% ацетоном (10 см<sup>3</sup>), после чего извлеченная часть хлорофилла отделялась фильтрованием через бумажный фильтр. Величиной, характеризующей прочность связи хлорофилла с белком, является процент хлорофилла, извлеченного 60% ацетоном, по отношению к хлорофиллу, полностью извлеченному 85% ацетоном из равной порции суспензии.

Результаты исследований приведены на рис. 1 и в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Результаты исследования суспензии хлоропластов, полученной из листьев свеклы (рН суспензии 6,5)

Дата опыта	Продолжительность и температура хранения суспензии	Фотохимическая активность хлоропластов в мм <sup>2</sup> O <sub>2</sub> в час на 1 см <sup>3</sup> суспензии	Содержание хлорофилла в мг в 1 см <sup>3</sup> суспензии	Колич. хлорофилла в мг, извлечен. 60% ацетоном из 1 см <sup>3</sup> суспензии	% хлорофилла, извлечен. 60% ацетоном, от общего колич. хлорофилла
25 IX	Свеже приготовл.	42,8	0,49	0,18	36,7
27 IX	2 д. при 2—3°	8,9	0,48	0,12	25,0
27 IX	То же + 2 ч. при 30°	5,8	0,48	0,14	29,2
1 X	6 д. при 2—3°	—	0,49	0,087	17,7
28 IX	Свеже приготовл.	58,9	0,62	0,26	41,9
29 IX	1 д. при 2—3°	39,4	0,59	0,18	30,5
9 IX	То же + 2 ч. при 30°	19,2	0,59	0,17	28,8
25 X	7 д. при 2—3°	10,6	0,62	0,12	20,0

При рассмотрении рис. 1 видно, что положение максимума (677,5 мμ), а также общий ход кривой поглощения света суспензией, определенный в день ее изготовления (28 IX), не изменяется в последующие дни определений (29 IX, 5 X), в то время как фотохимическая активность хлоропластов постепенно падает (табл. 1). Изменений в спектре поглощения не наблюдается и при снижении фотохимической

\* Определения проведены в лаборатории электронной микроскопии Отделения биологических наук АН СССР.

\*\* Определения на спектрофотометре системы Бекмана и проверка флуоресценции проводились в Институте биохимии Академии наук СССР в лаборатории акад. А. Н. Теренина. Выражаем глубокую благодарность сотрудникам лаборатории за проведение этих определений.

активности суспензии при воздействии на нее повышенной температуры (29 IX).

Аналогичный результат был получен и для суспензий хлоропластов, изготовленных из листьев фасоли.

Таким образом, падение фотохимической активности, наблюдаемое в условиях нашего опыта, не сопровождается изменением спектральных свойств суспензии.

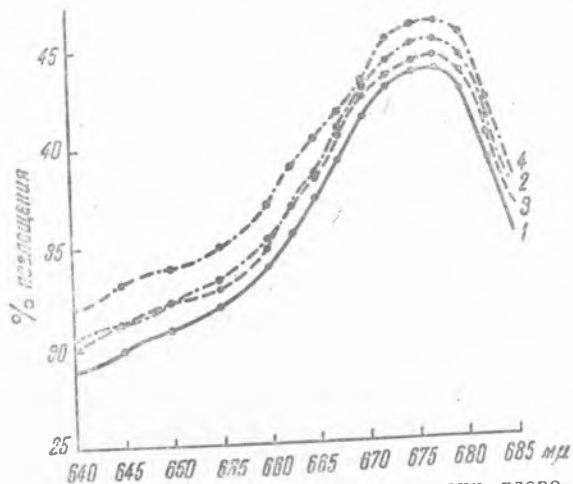


Рис. 1. Спектры поглощения суспензии хлоропластов свеклы, полученные в разные сроки хранения суспензии. 1—28 IX, день изготовления суспензии; 2—29 IX; 3—29 IX, суспензия выдержана 2 часа при 30°; 4—5 X

Проверка флуоресценции показала, что суспензии, потерявшие свою фотохимическую активность, не утрачивают способности флуоресцировать.

Определения прочности связи хлорофилла с белком, проведенные на суспензии хлоропластов из листьев фасоли, показали, что падение фотохимической активности хлоропластов, наблюдаемое при хранении суспензии, не сопровождается изменением извлекаемости хлорофилла (табл. 2). Точно так же воздействие на суспензию повышенных температур (+28—29°) в течение 2—3 час., снижающее активность реакции на 50—80%, не сказывается на извлекаемости хлорофилла (табл. 2).

Таблица 2

Результаты исследования суспензии хлоропластов, полученной из листьев фасоли (рН суспензии 6,5)

Дата опыта	Продолжительность и температура хранения суспензии	Фотохимическая активность суспензии хлоропластов в мм <sup>3</sup> O <sub>2</sub> в час на 1 см <sup>3</sup> суспензии	Содержание хлорофилла в мг в 1 см <sup>3</sup> суспензии	Колич. хлорофилла в мг, извлечен. 60% ацетоном из 1 см <sup>3</sup> суспензии	% хлорофилла, извлечен. 60% ацетоном, от общего колич. хлорофилла
15 VII	Свеже приготовл.	48,3	0,47	0,06	12,8
16 VII	1 д. при 2—3°	31,0	0,47	0,07	14,9
16 VII	То же +3 ч. при 28°	15,7	0,47	0,06	12,8
19 VII	4 д. при 2—3°	21,1	0,46	—	—
19 VII	То же +2 ч. при 29°	4,6	0,45	0,06	13,3
22 VII	7 д. при 2—3°	3,4	0,42	0,07	16,6
26 VII	Свеже приготовл.	27,3	0,39	0,15	38,5
27 VII	1 д. при 2—3°	12,7	0,38	0,15	39,5
27 VII	То же +2 ч. при 29°	3,3	0,37	0,15	40,5

Исследование суспензии хлоропластов из листьев свеклы обнаружило уменьшение извлекаемости хлорофилла при хранении суспензии в условиях пониженных температур (+2—3°) (табл. 1). Отсутствие подобных изменений у хлоропластов фасоли при одновременном снижении их фотохимической активности приводит нас к предположению о том, что и в случае хлоропластов свеклы изменения прочности связи хлорофилла с белком не являются основным фактором, обуславливающим инактивацию суспензии. В пользу этого предположения говорит тот факт, что падение фотохимической активности хлоропластов в условиях повышенной температуры не сопровождается изменением извлекаемости хлорофилла (опыт от 29 IX). Повидимому, белок хлоропластов свеклы в условиях пониженных температур претерпевает некоторые изменения, оказывающие влияние на извлекаемость хлорофилла. Однако эти изменения, очевидно, не затрагивают основных свойств хлорофилл-белкового комплекса, на что указывает отсутствие изменений в спектре поглощения суспензий.

Из данных табл. 1 и 2 видно, что содержание хлорофилла в суспензиях хлоропластов в процессе хранения суспензий и при действии на них температур 28—30° практически не меняется. Таким образом, инактивация суспензий в вышеприведенных случаях не связана с разрушением хлорофилла.

Результаты проведенного исследования указывают на достаточную устойчивость пигментного комплекса суспензии изолированных хлоропластов. Потеря фотохимической активности хлоропластов, наблюдаемая в процессе хранения суспензии (при температуре 2—3°) и при действии на нее повышенных температур, не обуславливается изменением состояния хлорофилла в суспензии. Очевидно, потеря активности суспензии хлоропластов связана с нарушением работы ее ферментной системы.

В заключение приносим глубокую благодарность проф. А. А. Ничипоровичу за руководство работой.

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

Поступило  
9 V 1949

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Т. Ф. Андреева и Л. Е. Зубкович, ДАН, 60, № 4 (1948). <sup>2</sup> М. С. Цвет, Тр. Об-ва естествоисп. при Казанск. ун-те, 35, в. 3 (1901). <sup>3</sup> В. Н. Любименко, Дневник Всеросс. съезда ботаников, Петроград, 1921, стр. 45; Изв. Росс. Ак. Наук, 17 (1923). <sup>4</sup> Т. Н. Годнев и О. П. Осипова, ДАН, 57, № 2 (1947). <sup>5</sup> О. П. Осипова, ДАН, 57, № 4 (1947). <sup>6</sup> Е. Р. Гюббенет, Природа, № 11 (1946). <sup>7</sup> Т. Н. Годнев и О. П. Осипова, Изв. АН БССР, № 1 (1948). <sup>8</sup> А. А. Красновский, Изв. АН СССР, сер. биол., № 3 (1947). <sup>9</sup> А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, 63, № 2 (1948). <sup>10</sup> О. Варбург и В. Люттгенс, Биохимия, 11, в. 4 (1946). <sup>11</sup> О. П. Осипова, ДАН, 57, 8 (1947).