

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Л. М. КОСОБУЦКАЯ

РАЗЛИЧНЫЕ СОСТОЯНИЯ ХЛОРОФИЛЛА В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 8 V 1953)

Исследование фотохимических и спектральных свойств хлорофилла в разных состояниях, проведенное ранее в нашей лаборатории, привело к заключению, что хлорофилл в растениях может находиться в различных состояниях в зависимости от стадии развития и внешних условий (1, 2). За последние годы нам удалось показать прямыми опытами взаимопереходы между разными состояниями хлорофилла в растениях и получить новые данные о природе этих состояний; краткому изложению этих результатов посвящена настоящая статья.

Изменение состояния хлорофилла в процессе его образования. При освещении этиолированных растений в них образуется и накапливается хлорофилл; мы исследовали в процессе зеленения: а) спектры поглощения коллоидных растворов вещества листьев фасоли*; б) общее количество образованного хлорофилла; в) фотохимическую устойчивость полученных коллоидных растворов при действии сильного освещения в области красного максимума поглощения хлорофилла.

Результаты опытов показаны на рис. 1. Этиолированные 7—9-дневные проростки фасоли освещали 200-ваттной лампой накаливания на расстоянии 70 см при 19°. Через разные промежутки времени отбирали пробы; 0,2 г листьев растирали при 0° с 4,5 мл фосфатного буфера (рН 7) 0,2 М, содержащего 0,01 М КСІ, отжимали через полотно, центрифугировали 10 мин. при 3500 g. Спектр поглощения раствора измеряли на спектрофотометре Бекмана, затем освещали 5 мин. на воздухе в фокусе конденсора 500-ваттной кинолампы через светофильтр RG-2 при 16° с тем, чтобы определить количество хлорофилла, разрушаемого при фотохимическом окислении.

В начале освещения из протохлорофилла с максимумом поглощения при 635 м μ образуется форма хлорофилла с красным максимумом поглощения при 670 м μ (ниже мы будем именовать ее «формой 670»); по мере дальнейшего освещения происходит накопление хлорофилла, сопровождающееся постепенным перемещением максимума полосы поглощения в сторону длинных волн — до 677—678 м μ ; этот максимум характерен для «обычной» формы хлорофилла в растениях («форма 678»). Первично образующаяся «форма 670» крайне неустойчива фотохимически и полностью выцветает в условиях опыта; по мере накопления хлорофилла растет его устойчивость к фотоокислению. Существенно, что на всех стадиях образования фотохимически разрушается количество хлорофилла, близкое к начальному количеству «формы 670»; при этом теряется красная флуоресценция раствора, наблюдаемая через светофильтр RG-5 при возбуждении группой ртутных линий при 365 м μ . Контрольные опыты по-

* Еще В. Н. Любименко показал подобие спектров поглощения хлорофилла в листьях и в коллоидных растворах «натурального хлорофилла» (3).

казали, что эту потерю флуоресценции нельзя приписать возможному ее тушению продуктами фотореакции или ростом их поглощения в области возбуждения; происходит разрушение флуоресцирующей фотоактивной формы хлорофилла.

Описанные опыты показывают, что хлорофилл в гранулах находится в различных состояниях: фотохимически неустойчивых, с красным максимумом поглощения при 670 м μ , и устойчивых, с конечным максимумом при 678 м. В начале зеленения доминирует «форма 670», тогда как через 16 час. в условиях опыта лишь около 3% хлорофилла находится в этом состоянии. Следует полагать, что именно активная «форма 670» подвергается обратимым фотохимическим превращениям при фотосинтезе (1), определяя также фотохимическую активность изолированных хлоропластов и коллоидных растворов вещества зеленых листьев. Действительно, фотоокисление, ведущее в условиях наших опытов к разрушению «формы 670» и к потере флуоресценции, приводит также к потере способности этих растворов к фотохимическому выделению кислорода, сопряженному с восстановлением фенол-индофенола.

Условия равновесия между разными состояниями хлорофилла. Повышение температуры ведет к сдвигу равновесия в сторону «формы 670». Давно известно, что нагревание листьев до 70—80° приводит к перемещению красного максимума поглощения от 678 до 670 м μ , что, однако, сопровождается нарушением структуры пластид. В работах Г. А. Тихова (4) показано, что у живых растений повышение температуры приводит к многократному усилению флуоресценции, что говорит о сдвиге состояний в сторону «формы 670». Подобным образом мы наблюдали усиление выцветания зеленых коллоидных растворов по мере повышения температуры. Пользуясь малой светопрочностью «формы 670», можно наблюдать взаимопереходы между состояниями хлорофилла у живых листьев. Если закрыть половину молодого листа фасоли черной бумагой и осветить лист конденсированным светом кинолампы либо ртутно-кварцевой лампой ПАРК-2 (в течение 3 мин. на расстоянии 30 см во льду), затем снять черную бумагу, то ясно видно ослабление флуоресценции у освещенной половины листа; при нагревании до ~30° флуоресценция снова восстанавливается, и различие между обеими половинами листа исчезает. После фотохимического разрушения «формы 670» в зеленых коллоидных растворах возвращение флуоресценции при нагревании происходит менее отчетливо и в меньшей степени, чем у листьев.

О природе разных состояний хлорофилла в растении. Исследования свойств хлорофилла в различных состояниях (1) показали, что флуоресценцией и максимумом поглощения от 660 до 670 м μ хлорофилл обладает в истинных растворах, эмульсиях и водных коллоидных растворах поверхностно-активных веществ (детергентов). Растворы хлорофилл-белково-липидного соединения также обладают максимумом поглощения при 670 м μ (5). С другой стороны, агрегация молекул ведет к потере флуоресценции и перемещению красной полосы поглощения хлорофилла в сторону длинных волн. Так, твердые пленки, полученные при испарении в вакууме эфирных растворов хлорофилла а и а + b, имеют максимум при 675—677 м μ ; в водных коллоидных растворах хлорофилла, в зависимости от степени коагуляции, максимум полосы поглощения лежит в пределах 670—690 м μ , что впервые было показано в работах Д. И. Ивановского (6).

Какова же природа первично образующейся в листьях «формы 670» хлорофилла? Известные факты указывают на то, что хлорофилл образуется из белково-липидного соединения протохлорофилла (2); наиболее вероятно, что «форма 670» также связана с липопротеином, однако поглощением в области 668—670 м обладают также растворы хлорофилла в липоидах и его первично агрегированные формы, теряющие флуоресценцию и, соответственно, более светопрочные; такие формы получаются,

например, при разбавлении водой растворов хлорофилла в спирте или ацетоне; их дальнейшая коагуляция ведет к сдвигу поглощения в сторону длинных волн.

На рис. 1 видно, что на 2—3 часу зеленения при сохранении максимума 670 м μ резко увеличивается светопрочность хлорофилла, что следует объяснить начинающейся агрегацией.

Мы уже указывали на то, что слабая связь хлорофилла с липопротеином определяет возможность диссоциации (1). Таким образом, полоса поглощения в области 670 м μ соответствует белково-липидному соединению хлорофилла, находящемуся в равновесии со свободным «коферментом» и начально-агрегированными формами. Накопление хлорофилла в процессе фотосинтеза приводит к его дальнейшей агрегации, упорядоченному расположению в гранулах, приводящему к конечному сдвигу максимума до 677—678 м μ .

О том, что этот сдвиг определяется агрегацией, а не весьма слабой связью хлорофилла с липопротеином, свидетельствуют следующие факты:

1) искусственные хлорофилл-белковые соединения (1, 8) и хлорофилл-липидопротеин, выделенный из листьев (6), обладают в растворе красным максимумом около 670 м μ , тогда как

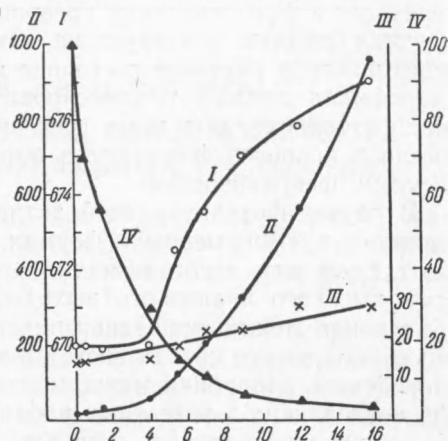
2) взаимодействие между молекулами хлорофилла, проявляющееся при их высокой концентрации в коллоидных частицах и твердых пленках, приводит к сдвигу максимума в красную область до 675—677 м μ ;

3) кристаллы «хлорофилл-липидопротеина», выделенные из листьев фасоли одним из нас с М. А. Борузиной по методу Такашима (5)*, обладают полосой поглощения при 690 м μ и лишены флуоресценции; их нагревание приводит к сдвигу полосы до 670 м μ и появлению флуоресценции вследствие дезагрегации; охлаждение снова приводит к перемещению полосы поглощения к 680 м μ и к потере флуоресценции; сходные явления с пленками бактериохлорофилла мы наблюдали ранее (8).

На основании вышеизложенного можно представить следующую схему состояний и превращений хлорофилла в растении (ХБЛ — хлорофилл-белково-липидное соединение);



* Здесь не будет рассматриваться вопрос, являются ли эти кристаллы естественным липопротеином или образованием иной природы; в подобных (5) условиях кристаллизации хлорофилла а + b также образует кристаллы.



Продолжительность освещения листьев в часах

Рис. 1. Изменение спектральных и фотохимических свойств хлорофилла в естественном состоянии по мере его образования в этиолированных листьях. I — положение главного красного максимума поглощения зеленого коллоидного раствора в м μ (± 1 м μ); II — количество образовавшегося хлорофилла в относительных единицах; III — количество выцветавшего хлорофилла в относительных единицах; IV — процент фотохимически разрушенного через 5 мин. хлорофилла (по изменению коэффициента погашения в максимуме)

Итак, хлорофилл, непрерывно синтезируемый в растении и связанный с белками и липоидами, находится в различных состояниях и формах, испытывающих превращения, зависящие от стадии развития и условий среды. В начале зеленения доминирует «мономерная» дезагрегированная форма хлорофилла (ХБЛ); дальнейший синтез приводит к накоплению агрегированной формы (ХБЛ)_n. Нагревание хлоропластов при интенсивном солнечном освещении смещает равновесие в сторону активной мономерной формы, которая, в свою очередь, при интенсивном фотосинтезе переходит в фотохимически превращенное состояние. Таким образом, пигментная система реагирует на изменение условий среды переходом из неактивного в активное состояние и обратно. Непрерывно идущий синтез хлорофилла должен компенсировать необратимые его превращения за счет фотоокисления и иных побочных реакций, тогда как участие хлорофилла в процессе фотосинтеза определяется его обратимыми фотохимическими превращениями.

В случае фотохимической активности лишь части хлорофилла, находящегося в «мономерных» формах, обладающих флуоресценцией, возникают трудности в согласовании этих представлений с известными фактами высокого квантового выхода фотосинтеза. В качестве возможного объяснения можно привлечь представления о миграции и передаче энергии поглощенного кванта света от агрегированных к мономерным формам хлорофилла. Подобная межмолекулярная передача энергии возбуждения исследована в известных работах школы С. И. Вавилова⁽⁹⁾ в области концентрационного тушения флуоресценции красителей; недавно А. Н. Теренин и В. Л. Ермолаев⁽¹⁰⁾ показали возможность передачи энергии с переходом воспринимающей энергию молекулы в длительно живущее бирадикальное (триплетное) состояние.

В заключение приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за обсуждение результатов работы.

Поступило
2 V 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Красновский, Докт. дисс., Ин-т биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, 1948; Сборн. Проблемы биохимии, стр. 27, 1948; обзор Фотосинтез растений в сборн. Усп. биол. хим., 1, 1950, стр. 473; А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, 63, 163 (1948). ² А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, 85, 177 (1952). ³ В. Н. Любименко, Фотосинтез и хемосинтез в растительном мире, 1935. ⁴ Г. А. Тихов, ДАН, 78, 133 (1951). ⁵ S. Takashima, Nature, 169, 182 (1952). ⁶ Д. И. Ивановский, О физическом состоянии хлорофилла в живых листьях, Варшава, 1913. ⁷ Т. Н. Годнев, О. П. Осипова, ДАН, 57, 161 (1947); О. П. Осипова, ДАН, 57, 371 (1947); 57, 799 (1947). ⁸ А. А. Красновский, К. К. Войновская, Л. М. Кособуцкая, ДАН, 85, 389 (1952). ⁹ С. И. Вавилов, ЖЭТФ, 13, 13 (1943). ¹⁰ А. Н. Теренин, В. Л. Ермолаев, ДАН, 85, 547 (1952).