

Л. А. НЕЗГОВОРОВ

РАЗРУШЕНИЕ ХЛОРОФИЛЛА ПЛАСТИД И ЗАЩИТНАЯ РОЛЬ БЕЛКОВ ЦИТОПЛАЗМЫ

(Представлено академиком В. Н. Сукачевым 17 IV 1953)

Для выделения отдельных элементов клетки наиболее часто применяется дифференциальное центрифугирование, т. е. разделение различных по удельному весу частей предварительно разрушенной клетки путем варьирования скоростей и продолжительности центрифугирования. Из структурных элементов растительной клетки наиболее детальному исследованию методом изолирования подвергаются пластиды в целях изучения их состава и роли во внутриклеточном распределении ферментов (^{1, 2}). Повышенный интерес к последнему был вызван работами А. И. Опарина, А. Л. Курсанова и др., создавших теорию действия ферментов в живом организме. Согласно этой теории, направленность того или иного ферментативного процесса в клетке обуславливается соотношением количеств адсорбированного и свободного фермента. Это соотношение, в свою очередь, зависит от воздействия на растение постоянно изменяющихся условий существования.

Наряду с интенсивным изучением самих пластид представляет безусловный интерес выяснение взаимоотношений их с цитоплазмой и возможной роли последней в жизнедеятельности пластид. В связи с этим мы решили, несмотря на все несовершенство существующих методов расчленения растительной клетки, попытаться выяснить вопрос о возможной роли цитоплазмы в процессе разрушения хлорофилла пластид.

В начале этого столетия В. Н. Любименко (³) пришел к выводу, что присутствующие в листовой ткани окислительные ферменты способны весьма энергично окислять хлорофилл с образованием бесцветных продуктов и что количество разрушенного хлорофилла возрастает с увеличением концентрации фермента, хотя полной пропорциональности при этом автору наблюдать и не удавалось. Им же обнаружено, что в присутствии антисептиков процесс разрушения хлорофилла значительно ускоряется. Принимая во внимание эти наблюдения В. Н. Любименко, а также методические трудности прямого решения поставленного выше вопроса, мы сочли целесообразным, во-первых, выяснить, идет ли разрушение хлорофилла в изолированных пластидах и ускоряется ли этот процесс дополнительным внесением окислительных ферментов. Во-вторых, уточнить действие антисептиков на изучаемый процесс и попытаться отыскать среди них такой, который в возможно меньшей степени влиял бы на разрушение хлорофилла пластид.

Методика. При изолировании пластид, для уменьшения их разрушения, навеска свежих листьев растиралась в 0,5 М растворе сахарозы. Остатки механических тканей и свободные зерна крахмала удалялись центрифугированием в течение 2 мин. при 2,5—3 тыс. об/мин. Затем в серию небольших центрифужных пробирок вносилось по 5—10 мл вытяжки и для осаждения пластид, соответственно, по 0,25—0,50 мл 2 М раствора CaCl_2 . Если флоккуляция долгое время не наступала, то добавлялось еще несколько капель CaCl_2 , а в исключительных случаях по 1—2 капли 1% FeCl_3 . Для ускорения осаждения пластид применялось центрифугирование с последующей однократной промывкой осадка

раствором сахарозы. Исходное количество хлорофилла в осадке пластид определялось после многократной экстракции 85% ацетоном на спектрофотометре Кениг — Мартенса. Осадок пластид, шедших в опыт, взмучивался в тех же пробирках энергичным встряхиванием в 0,5—0,25 М растворе сахарозы на 1/15 М фосфатном буфере рН 7, и к нему добавлялось, в соответствии со схемой опыта, то вещество, действие

Таблица 1

Действие антисептиков на разрушение хлорофилла пластид (на 10 г листьев)

	Экспозиция в час.	Исходн. содержание в мг	Конечное содержание хлорофилла					
			без антисептика		с хлороформом		с натрием фтористым	
			мг	% разруш.	мг	% разруш.	мг	% разруш.
Шпинат	40	4,54	4,40	3	3,3	27	4,28	6
"	22	4,41	3,29	25	2,85	35	3,57	19
Сорго сахарное	23	5,37	5,05	6	3,72	31	4,52	16
Свекла сахарная	45	4,50	4,25	6	—	—	3,90	13
Пшеница	26	2,95	2,35	20	—	—	2,05	30

которого на разрушение хлорофилла исследовалось. Пробирки с хлоропластами экспонировались в темноте или при слабом освещении и за время экспозиции несколько раз энергично встряхивались. По окончании экспозиции (через 20—30 час.) хлоропласты осаждались центрифугированием, и из осадка извлекался оставшийся неразрушенным хлорофилл.

Действие антисептиков. Установление факта ускорения разрушения хлорофилла в растертой массе листьев побудило В. Н. Любименко⁽³⁾ высказать пред-

положение о наличии в пластидах фермента — антиоксидазы, защищающей их хлорофилл от разрушающего действия оксидаз и инактивирующейся при действии антисептиков. Однако полученные позднее данные⁽⁴⁾ позволяют считать, что антисептики денатурируют хромо-липопротеидный комплекс, освобождая хлорофилл, который затем легко разрушается.

Нами изучение действия антисептиков предпринято в целях отыскания среди них такого, который, предохраняя от внешней инфекции, минимально влиял бы на разрушение хлорофилла пластид. Совершенно избежать вредного действия антисептика, вероятно, невозможно, поскольку хлоропласты, как внутриклеточные плазматические образования, несомненно, более чувствительны, чем бактериальные клетки, против которых направляется его действие. Первые же опыты показали, что все испытанные нами антисептики (хлороформ, формалин, тимол, фтористый натрий) в большей или меньшей степени вызывают ускорение процесса разрушения хлорофилла пластид. Наименее ядовитым оказался раствор фтористого натрия, который и использовался в дальнейшем там, где это предусматривалось схемой опыта. Данные, характеризующие действие двух антисептиков — хлороформа и фтористого натрия, приведены в табл. 1.

Эти опыты показали также, что в пластидах, изолированных от остального содержимого клеток и, в частности, от цитоплазмы, идет разрушение хлорофилла, и если этот процесс ферментативный, то катализаторы имеются в самих хлоропластах. Но предстояло еще выяснить, не может ли процесс разрушения хлорофилла быть ускорен за счет окислительных ферментов, находящихся вне пластид.

Действие окислительных ферментов. На основании имеющихся литературных данных трудно сделать обоснованное предположение о возможном влиянии свободных ферментов, находящихся вне пластид, на разрушение хлорофилла последних. Это трудно хотя бы потому, что по вопросу о внутриклеточном распределении окисли-

тельных ферментов нет единого мнения. На смену существовавшему ранее утверждению о локализации их исключительно вне пластид (5) получены новые данные, говорящие о преимущественном нахождении пероксидазы и полифенолоксидазы в пластидах (1). Описанный выше факт разрушения хлорофилла в изолированных пластидах также говорит о наличии в них самих катализаторов этого процесса. Для выяснения возможности ускорения разрушения хлорофилла мы добавляли к хлоропластам, взвешенным в 0,5 М растворе сахарозы, водные вытяжки из редьки и этиолированных проростков пшеницы, богатых окислительными ферментами. В опыте с пластидами из листьев примулы добавлялся водный раствор готового препарата пероксидазы, но без добавления извне H_2O_2 . Результаты опытов приведены в табл. 2. Приведенные данные показывают, что добавление к взвеси изолированных хлоропластовых вытяжек, богатых окислительными ферментами, не только не ускоряет процесса разрушения их хлорофилла, а наоборот, уменьшает скорость этого процесса. Кипячение вытяжек, особенно из листьев, уменьшает их защитное действие.

Таблица 2

Действие окислительных ферментов на разрушение хлорофилла пластид (на 10 г листьев)

	Продолжит. опыта в час.	Исходн. содержание в мг	Конечное содержание хлорофилла			
			в пластидах		в пласт. + вытяжка с ферментами	
			мг	% разруш.	мг	% разруш.
Примула	66	1,24	0,82	34	1,02	18
Ячмень	36	1,80	1,38	23	1,72	4
Свекла сахарная	48	2,60	2,00	23	2,17	17
То же	23	3,65	3,16	13	3,30	10

Роль цитоплазмы. Косвенные данные для суждения о возможной роли цитоплазмы в разрушении хлорофилла пластид уже дают описанные выше опыты. Тот факт, что процесс этот идет в изолированных от плазмы пластидах и не ускоряется добавлением ферментативных вытяжек извне, дает основание полагать, что вещества цитоплазмы должны действовать аналогичным образом, т. е. замедлять процесс разрушения хлорофилла. Желая подтвердить это прямым экспериментом, мы считали возможным, воспользовавшись описанным выше методом выделения пластид, условно считать остаток после их осаждения «цитоплазмой». Пренебрегая имевшимися там же веществами клеточного сока, мы поставили, однако, специальные опыты для уточнения влияния их на изучаемый процесс. «Клеточный сок» мы извлекали легким отжатием листьев, обработанных предварительно эфиром (6). Опыты проводились с листьями сахарной свеклы, примулы и проростков ячменя.

Опыты со свеклой проводились в середине лета со взрослыми, хорошо развитыми листьями. Пластиды взмучивались в 0,5 М растворе сахарозы на 1/15 М фосфатном буфере pH 7 и к ним добавлялось по 3 мл вытяжки после осаждения из нее пластид («плазма») или 3 мл «сока», получавшегося отжатием из 1,5 г листьев, обработанных эфиром. Так как «плазма» была слегка окрашена, то количество содержащегося в ней хлорофилла учитывалось при последующих расчетах. Опыты с ячменем проводились зимой на проростках в фазе второго листа. Пластиды осаждались с большим трудом, поэтому доосаждение их производилось добавлением на 10 мл вытяжки двух капель 1% $FeCl_3$. Оставшаяся вытяжка («плазма») практически была неокрашенной. Осадок пластид небольшой, количество содержащегося в нем хлорофилла, соответственно, низкое. Опыты с примулой проводились зимой с молодыми листьями хорошо растущего растения. Результаты этих опытов приведены в табл. 3.

Полученные данные говорят о том, что вещества цитоплазмы предохраняют хлоропласт от разрушения. «Клеточный сок» и прокипяченная вытяжка «плазмы» защитными свойствами не обладают.

Таблица 3

Действие цитоплазмы на разрушение хлорофилла пластид (на 10 г листьев)

	Продолжит. опыта в час.	Исходн. содержание в мг		Конечное содержание хлорофилла						
				пластиды		пластиды + «плазма»		пластиды + «сок»		
		мг	% разруш.	мг	% разруш.	мг	% разруш.	мг	% разруш.	
		Свекла сахарная	24	4,08	3,08	24	3,91	4	3,23	21
Ячмень	36	1,80	1,38	27	1,88	0	—	—		
Примула	66	1,24	0,82	34	1,13	9	—	—		

Таблица 4

Действие пептона на разрушение хлорофилла пластид (на 10 г листьев)

	Продолжит. опыта в час.	Исходн. содержание в мг		Конечное содержание хлорофилла			
				пластиды		пластиды + пептон	
		мг	% разруш.	мг	% разруш.	мг	% разруш.
		Ячмень	22	2,66	1,64	38	1,92
Овес	33	3,08	1,36	56	1,72	44	
Шпинат	27	3,94	3,25	18	3,51	11	
Пшеница	26	2,95	2,35	20	2,47	16	

Какова же природа этих защитных веществ? Работы, посвященные изучению разрушения хлорофилла в чистых растворах и коллоидных экстрактах из листьев, а также факт повышения его устойчивости к выцветанию при соединении с белком (4) давали основание полагать, что и в изучаемом нами случае защитная роль принадлежит, в основном, белкам цитоплазмы. Об этом же говорят наблюдавшиеся нами факты значительного уменьшения защитного действия вытяжек при их кипячении. Для проверки этого было испытано влияние раствора пептона на разрушение хлорофилла пластид. Раствор пептона добавлялся к взвеси изолированных пластид в растворе сахарозы на фосфатном буфере рН 7 до получения 0,2—0,3% раствора. Результаты этих опытов, приведенные в табл. 4, показали, что во всех случаях добавление пептона уменьшает скорость разрушения хлорофилла. Это подтверждает нашу уверенность в том, что из большого разнообразия веществ цитоплазмы именно белкам и ближайшим продуктам их разрушения присуща защитная функция. Однако белки не предотвращают разрушения хлорофилла, уже освобожденного денатурацией пластид антисептиками. Это дает основание полагать, что в данном случае функция белков состоит не в защите уже освобожденного хлорофилла, а в предохранении от денатурации пластиды в целом.

Данный случай, так же как и преимущественное нахождение амилазы вне пластид (7), показывает, что возможная физиологическая самостоятельность пластид в отправлениях ряда функций не исключает, а наоборот, предполагает тесную связь их с остальным содержимым клетки, в том числе и с цитоплазмой, в едином процессе обмена веществ растительной клетки.

Поступило
17 IV 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. М. Сисакян, Ферментативная активность протоплазмальных структур изд. АН СССР, 1951. ² Т. Е. Weier, C. R. Stocking, Bot. Rev., 18, № 1 (1952). ³ В. Н. Любименко, Зап. имп. Акад. наук, 33, № 12 (1916). ⁴ Е. Рабинович, Фотосинтез, М., 1951. ⁵ G. Krossing, Biochem. Z., 305, 5—6 (1940). ⁶ A. G. Chibnall, J. Biol. Chem., 55 (1923). ⁷ Л. А. Незговорев, ДАН, 30, № 3 (1941).