

*И. РЕНГЕ, К. МАУРИНГ, Р. АВАРМАА*

## ТОНКОСТРУКТУРНЫЕ СПЕКТРЫ ХЛОРОФИЛЛОВЫХ ПИГМЕНТОВ В ЗЕЛЕНЕЮЩИХ ЛИСТЯХ ПРИ 5 К

*I. RENGE, K. MAURING, R. AVARMAA. KLOORIFOLLPIGMENTIDE PEENSTRUKTUURILISED  
SPEKTRID ROHENEVATES LEHTEDES TEMPERATUURIL 5 K*

*I. RENGE, K. MAURING, R. AVARMAA. FINE-STRUCTURE SPECTRA OF CHLOROPHYLL PIG-  
MENTS IN GREENING LEAVES AT 5 K*

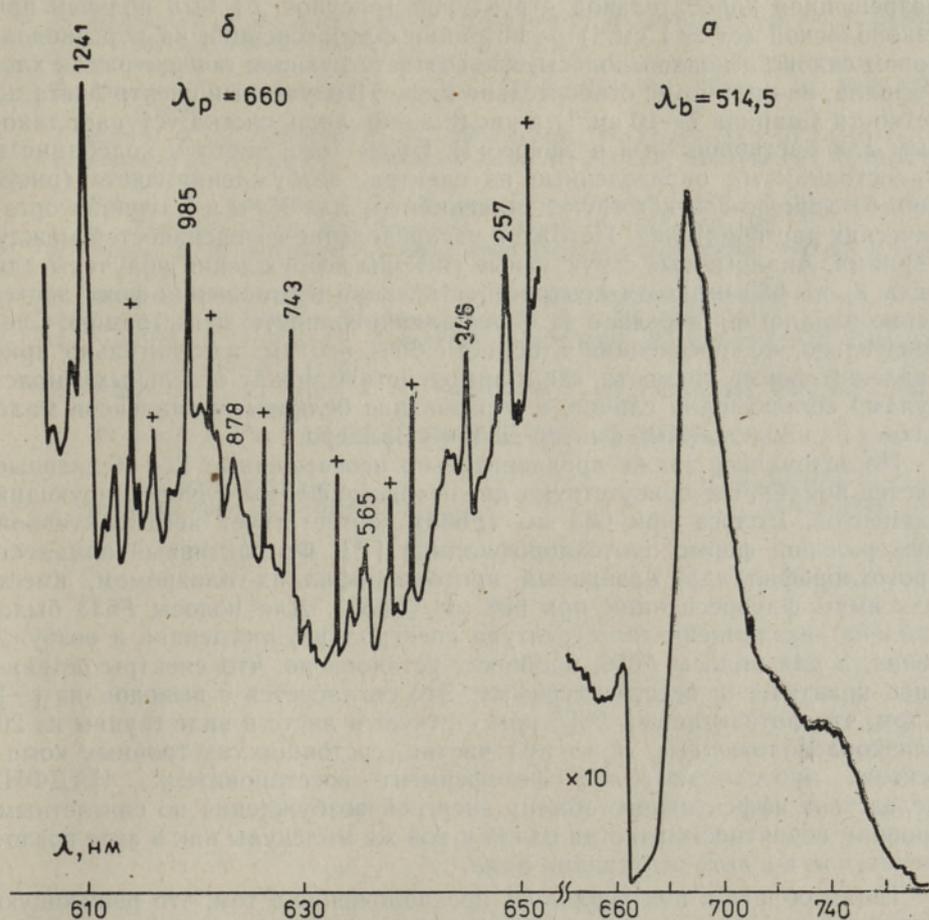
*(Представил К. К. Ребане)*

Благодаря применению лазерных источников возбуждения в последние годы достигнут значительный прогресс в спектроскопии хлорофиллоподобных пигментов, выделенных из растений и включенных в матрицы органических растворителей. Установлено, что при гелиевых температурах электронным спектрам этих биологически важных соединений характерна тонкая колебательная структура, которая проявляется только при селективном возбуждении вследствие частичного снятия неоднородного уширения [1, 2]. Из тонкоструктурных спектров определено большое число частот внутримолекулярных колебаний как в основном, так и в первом синглетно-возбужденном состояниях [3-5]. Методом спектрального выжигания провала получены подробные сведения об однородных ширинах бесфононных линий, о контуре и интенсивности фононных крыльев, т. е. об электрон-фононном взаимодействии с матрицей и т. п. [6, 7]. До сих пор эта информация не находила прямого применения для изучения структурной организации фотосинтезирующих мембран, так как спектры люминесценции зеленых листьев, хлоропластов и их субъединиц оставались широкополосными даже при 4,2 К и лазерном возбуждении [2, 8].

В [2, 9] были рассмотрены следующие возможности объяснения, почему в изучаемых биологических объектах квазилинейчатая структура отсутствует, несмотря на применение селективного возбуждения и низких температур. Во-первых, бесфононные линии как таковые могут отсутствовать из-за сильного электрон-фононного взаимодействия со средой, ибо все пигменты прочно связаны в белковые комплексы. Во-вторых, линии могут не обнаруживаться вследствие быстрой миграции энергии между молекулами пигмента в пределах неоднородной полосы.

Анализ указанных причин привел нас к выводу, что условия для проявления квазилинейчатых спектров в растениях, выращенных в темноте (этиолированные растения), где локальная концентрация пигментов и степень их ассоциации меньше, должны быть более благоприятными, чем в зеленых листьях с уже сформировавшимися фотосинтетическими единицами [10]. Действительно, в настоящей работе впервые удалось зарегистрировать тонкоструктурные спектры хлорофилловых пигментов в этиолированных и зеленеющих листьях.

Использованная спектральная аппаратура, включающая перестраи-



Спектр флуоресценции зеленеющего (см. текст) листа ячменя (а) при  $T = 5$  К и возбуждении  $\lambda_b = 514,5$  нм; спектр возбуждения флуоресценции (б) того же листа для регистрации на длине волны 660 нм, записанный при постоянной выходной мощности лазера  $\approx 5$  мВт на красителе. Цифрами указаны колебательные частоты  $S_1$ -состояния, определенные с помощью калибровочных линий Ne, обозначенных крестиками.

ваемый лазер на красителе с шириной линии  $\leq 1$   $\text{cm}^{-1}$ , описана в [5]. Для калибровки длины волны лазера применялась система автоматической маркировки с помощью оптогальванического эффекта на атомных линиях неона [11]. Кусочки листьев (размером около  $5 \times 5$  мм), выращенных в темноте при  $20-25^\circ\text{C}$  в течение 12 дней, освещались короткое время при комнатной температуре и затем охлаждались парами гелия до температуры 5 К.

На рисунке, а представлен низкотемпературный спектр флуоресценции этиолированного листа, экспонированного в течение 6 ч на дневном свете. В этой стадии в листе уже имеется значительное количество антенного хлорофилла, но полоса фотосистемы 1 около 740 нм еще не образовалась. Полоса с максимумом 685 нм соответствует различным формам хлорофилла *a* (Хл-*a*), возможно, и его бесфитольному предшественнику — хлорофиллиду [10]. В спектре флуоресценции в данном случае трудно получить тонкую структуру из-за наложения полос различных форм, а также из-за сравнительно большой концентрации хлорофилла около максимума полосы. Квазилинейчатый спектр возбуждения с хорошо

разрешенной колебательной структурой (рисунок, б) был получен при узкополосной ( $\delta\nu \approx 1 \text{ см}^{-1}$ ) регистрации флуоресценции на коротковолновом склоне основной полосы, где соответствующая концентрация хлорофилла, по-видимому, относительно низка. Полученный спектр листа по четкости (ширина 7—10  $\text{см}^{-1}$ ) и числу линий лишь слегка уступает таковым для растворов Хл-а в эфире [5]. Более того, частоты колебания в  $S_1$ -состоянии  $\omega_i$ , определенные из спектра возбуждения листа (рисунок, б) хорошо соответствуют значениям  $\omega_i$  для Хл-а в матрицах органических растворителей. Похоже и распределение интенсивностей между линиями. Аналогичные структурные спектры возбуждения получены для ряда  $\lambda_p$  до 680 нм, хотя контрастность линий в отношении фона постепенно падала при переходе на более длинноволновую регистрацию. Следовательно, флуоресценция в области 660—680 нм действительно принадлежит форме пигмента, где взаимодействие между отдельными молекулами хлорофилла слабое, а образование белковых комплексов мало влияет на наблюдаемый фактор Дебая—Валлера.

Исследовались также предварительно неосвещенные 12—16-дневные листья ячменя, где присутствуют две основные формы флуоресцирующих пигментов. Полоса при 633 нм ( $F_{633}$ ) соответствует нефотоактивной спектральной форме протохлорофиллида [10]. Фотоактивный комплекс протохлорофиллида, названный протохлорофиллид-голохромом, имеет максимум флуоресценции при 656 нм ( $F_{656}$ ). Для полосы  $F_{633}$  была найдена квазилинейчатая структура спектров флуоресценции и возбуждения, а для полосы  $F_{656}$ , наоборот, установлено, что спектры оставались практически бесструктурными. Это согласуется с выводом из [12] о том, что фотоактивный  $F_{656}$  присутствует в листе в виде группы из 20 близкорасположенных (2—3 нм) частиц, состоящих из тройных комплексов протохлорофиллид—фотофермент—восстановитель НАДФН. Вследствие эффективного обмена энергией возбуждения по синглетным уровням вероятность участия одной и той же молекулы как в акте поглощения, так и в акте испускания мала.

Таким образом, подтвердилось предположение о том, что решающую роль в исчезновении линейчатой структуры спектров играет высокая концентрация пигментных молекул в хлоропластах, ведущая к быстрой миграции энергии. Однако само образование пигмент-белковых комплексов не препятствует возникновению квазилиний.

Наши результаты согласуются с данными наблюдений узких провалов в спектрах нативных форм фикобилипротеинов в растворах при 1,8 К [13] и квазилинейчатой структуры в спектрах флуоресценции безметаллового цитохрома С [14]. Возможность выжигания провала в области спектра поглощения реакционных центров хлореллы [15] указывает на то, что в определенных условиях проявление бесфонных линий возможно также в зрелых хлоропластах.

Результаты настоящей работы позволяют расширить область применения тонкоструктурной спектроскопии, по меньшей мере, для исследования нативных форм хлорофилла в ходе образования фотосинтезирующего аппарата.

Авторы искренне благодарны К. К. Ребане за внимание и интерес к данной тематике.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Авармаа Р. Изв. АН ЭстССР. Физ. Матем., 23, № 1, 93—94 (1974).
2. Avarmaa, R., Rebane, K. Stud. biophys., 48, № 3, 209—218 (1975).
3. Авармаа Р., Тамкиви Р., Кийслер С., Нымм В. Изв. АН ЭстССР. Физ. Матем., 29, № 1, 39—45 (1980).

4. Быковская Л. А., Литвин Ф. Ф., Персонов Р. И., Романовский Ю. В. Биофизика, **25**, № 1, 13—20 (1980).
5. Rebane, K. K., Avarmaa, R. A. Chem. Phys., **68**, № 1/2, 191—200 (1982).
6. Мауринг К. Х., Авармаа Р. А. Изв. АН ЭстССР. Физ. Матем., **31**, № 2, 155—160 (1982).
7. Rebane, K. K., Avarmaa, R. A. J. Photochem., **17**, № 3/4, 311—317 (1981).
8. Авармаа Р., Кочубей С., Тамкиви Р. Изв. АН ЭстССР. Физ. Матем., **28**, № 1, 86—89 (1979).
9. Rebane, K., Avarmaa, R. In: Molecular Spectroscopy of Dense Phases. Proc. 12th European Congr. Mol. Spectrosc., Strasbourg, 1975, 459—462.
10. Раскин В. И. Фотовосстановление протохлорофиллида. Минск, «Наука и техника», 1981.
11. Авармаа Р., Суйсалу А. Изв. АН ЭстССР. Физ. Матем. (в печати).
12. Thorne, S. W. Biochim. Biophys. Acta, **226**, № 1, 113—127 (1971).
13. Friedrich, J., Scheer, H., Zickendraht-Wendelstadt, B., Haarer, D. J. Luminescence, **24/25**, 815—817 (1981).
14. Angiolillo, P. J., Leigh, J. S., Vanderkooi, J. M. Photochem. Photobiol., **36**, № 2, 133—137 (1982).
15. Маслов В. Г. Докл. АН СССР, **246**, № 6, 1511—1513 (1980).

Институт физики  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
11/VII 1983