

大豆光合生理生态的研究

第五报 大豆光合作用中叶绿素 a、b 间的能量传递*

唐树延 孟继武

杨文杰 苗以农

(中国科学院长春物理所)

(东北师范大学生物系)

摘 要

在大豆不同生育期色素含量与组份比分析的基础上,研究了大豆色素分子之间的相互作用。通过叶绿素 a、b 吸收光谱、发射光谱、激发光谱以及选择激发的发光光谱,证明了叶绿素 a、b 之间存在着共振能量传递。利用位形座标模型讨论了黑农26大豆体内天线叶绿素 b 向叶绿素 a 传递能量的途径。并指出在大豆光合作用中,共振传递是极为重要的能量传递方式。

前 言

高等绿色植物体内存在着叶绿素 a 和叶绿素 b 两种叶绿素。在大豆叶绿体的光合作用中,叶绿素 a (Chla) 是“天线”色素,也是“中心”色素(唐树延,1982; Norris, 1974) 它起着光能捕获和电荷分离的双重作用(Katz, 1973); 叶绿素 b (Chlb) 则只起“天线”的光能吸收和传递作用。叶绿素 a、b 之间的能量传递效率是很高的(梅镇安, 1981, Campillo, 1976)。

近年,随着激光和光谱技术的迅速发展,光合作用机理以及光能利用研究已越来越多(Porter, 1978; Barber, 1978)。但是,运用发光物理方法研究大豆色素分子之间的能量传递过程的工作尚未见报导。本工作目的在于研究大豆色素分子光谱的同时,着重地研究了色素分子间的能量传递途径和属于哪种类型的能量传递,这对于了解光对作物的作用和提高光能利用效率是十分重要的。

实 验 和 结 果

1. 样 品

色素 Chla、b 是从黑农 26 大豆叶片中用文献(杨善元, 1979)报导的方法提取和纯化的。

大豆叶绿体采用 Hall (1975) 的方法制备。叶绿素浓度按 Arnon (1949) 的方法分析。

* 本工作承蒙徐叙瑛教授关怀和指导。叶绿素光谱测试由于宝贵、关中素二同志完成。在此致谢。
本文于1985年1月28日收到。

所用仪器为日立UV—360型双光束分光光度计，日立MPF—4型荧光分光光度计。选择激发实验的激发源，还用了He—Ne激光器，波长632.8nm线，功率40mw，产生的荧光由光电倍增管接受，经光子计数放大器后，由T—800三光栅光谱仪记录。

2. 可见与紫外吸收光谱

配制 Chla: $1.2 \times 10^{-5} \text{M}$, Chlb: $4 \times 10^{-6} \text{M}$ 和 Chla+b 等浓度的丙酮混合溶液。制备大豆叶绿体缓冲液，其中 Chl 含量为 $15 \mu\text{g/ml}$ ，测量吸收光谱列于表 1。

表 1. 大豆色素和叶绿体吸收光谱数据

Table 1. Data from the absorption spectra of pigment and chloroplast of soybean

Chla 丙酮溶液		Chlb 丙酮溶液		Chla+b 丙酮溶液		Tris 叶绿体缓冲液	
吸收峰 (nm)	相对吸光度 (1.cm.M.)	吸收峰 (nm)	相对吸光度 (1.cm.M.)	吸收峰 (nm)	相对吸光度 (1.cm.M.)	吸收峰 (nm)	相对吸光度 (1.cm.M.)
664	1.00	640	1.00	664	1.00	679	1.00
625	0.31	595	0.24	645	0.45	664	0.89
575	0.19	545	0.09	625	0.29	655	0.42
525	0.11	470	2.05	575	0.13	624	0.23
480	1.29	429	0.65	489	1.31	575	0.18
410	0.66			430	0.72	489	1.19
380	0.24			418	0.89	430	1.30
				385	0.28	418	0.95
						385	0.84

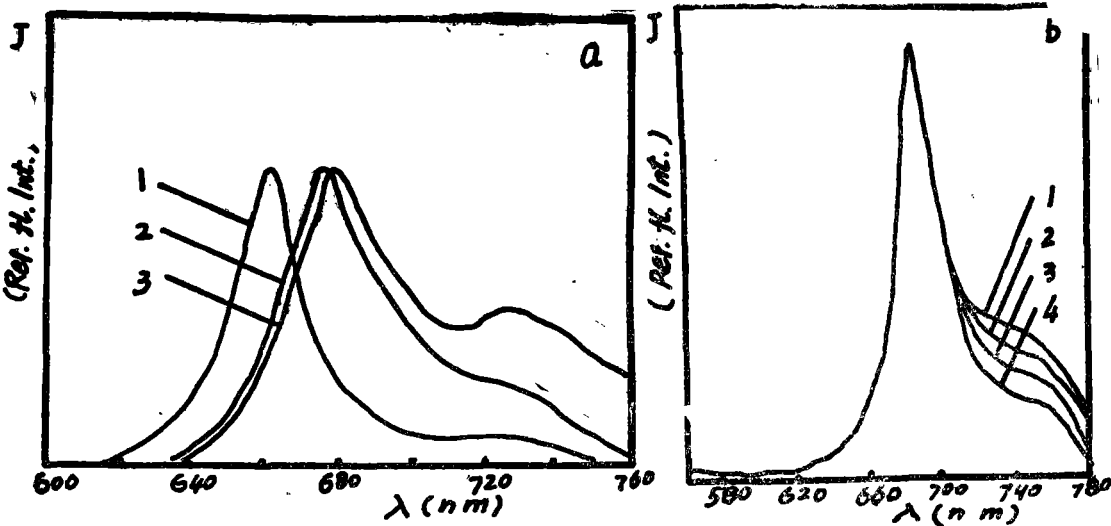


图 1. 大豆色素和叶绿体的荧光发射光谱

Fig 1. Fluorescence emission spectra for the pigment and chloroplast of soybean.

- a) 1. Chlb. $4 \cdot 10^{-6} \text{M}$. 丙酮溶液
2. Chla. $1.2 \cdot 10^{-5} \text{M}$ + Chlb. $4 \cdot 10^{-6} \text{M}$ 丙酮溶液
3. Chla. $1.2 \cdot 10^{-5} \text{M}$ 丙酮溶液

- b) 黑农26叶绿体Chl: $2.5 \mu\text{g/ml}$.
The chloroplast Hei'ong 26 chl: $2.5 \mu\text{g/ml}$. λ_{exc} . (激发波长 exc. wavelength):
1. 632.8nm. 2. 470nm
3. 430nm 4. 406nm. $T=298\text{k}$

3. 荧光发射光谱

在室温 (298k) 下, 采用 MPF—4 荧光分光光度计 (氙灯作激发源) 测量荧光光谱。当激发波长为 430nm 时, 观察到色素的不同荧光发射光谱, 强度归一化的光谱结果示于图 1。用不同波长的光激发大豆叶绿体, 发现体内的发光通过 Chla 的光谱形式表达出来。说明被激发的各色素分子之间发生了有效的能量传递。

4. 激发光谱和选择激发的发光光谱

图 2 分别为 Chla, Chlb, Chla + b 和大豆叶绿体的激发光谱。

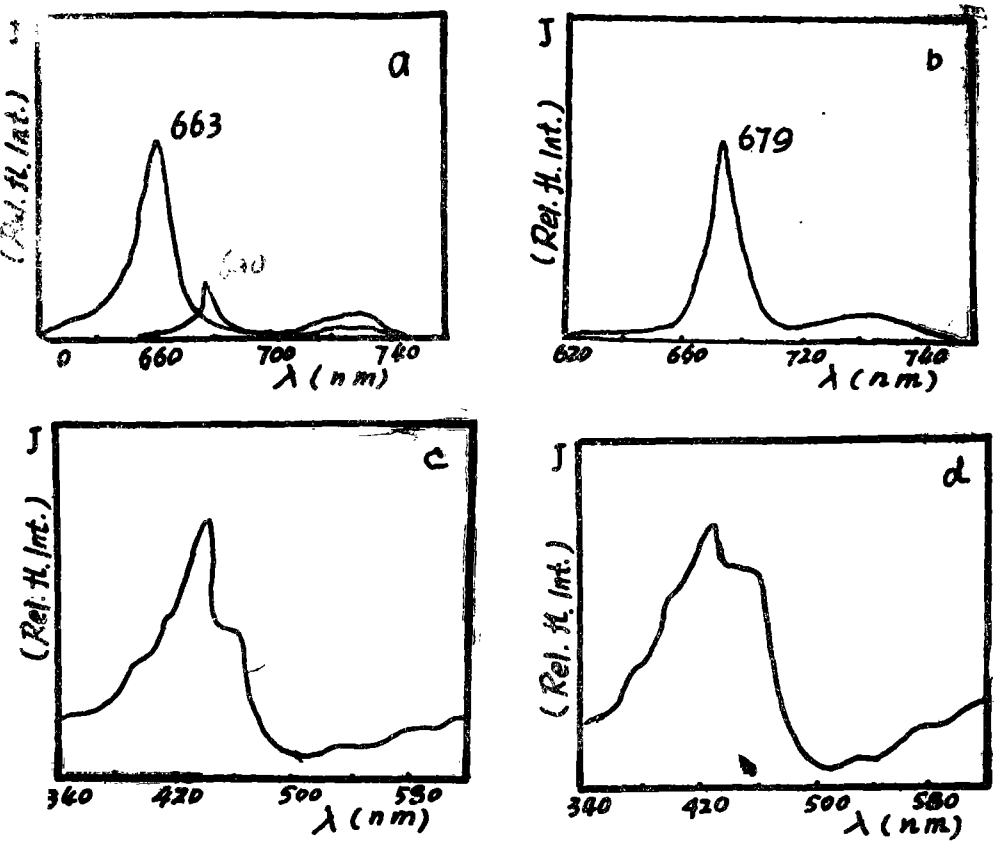


图 2. 大豆色素和叶绿体的激发光谱

Fig. 2. Excitation spectra for pigment and chloroplast of soybean.
监测荧光峰值分别为: Measured fluor. max;
a. Chla: 680nm.
b. Chlb: 656nm.
c. Chla, b 679nm.
d. 叶绿体: 682nm.
Chloroplast: 682nm.

从激发光谱中可以看到：Chla 的由六个带组成，峰值有 340nm、390nm、406nm、430nm、530nm 和 572nm，Chlb 有三条带，峰位是 340nm、470nm 和 595nm，图 2 (c) 是混合体中监测 Chla 的 679nm 发光带的激发光谱，与图 2 (d) 叶绿体的激发光谱比较有两点相似处：(1) 激发光谱的峰位基本一致，均有 340nm、385nm、418nm、430nm、465nm、545nm 和 580nm；(2) 叶绿素 a、b 的特征激发带也都一一对应。这样的实验结果，充分地表明大豆叶绿体内的色素和配制的色素体系之间有着密切的联系。

为了解叶绿素 a、b 之间发生的能量传递，用选择激发的发光实验提供了直接证据。在光谱分析的基础上，我们选用由氙灯分光得到的 470nm 谱线光去激发 Chla，Chlb，Chla+b 和叶绿体样品，由于 470nm 是 Chlb 的特征激发带，而不是 Chla 的激发带，它能有效地激发 Chlb，激发 Chla 就困难了，实验结果也是这样（见图 3）。用 470nm 波长的光激发混合体样品时，只看到了 Chla 的强发光，而没有 Chlb 的发光，说明被激发的 Chlb 分子将能量传给了 Chla，使 Chla 发光，实现了 Chla 与 b 之间的无辐射的能量传递。

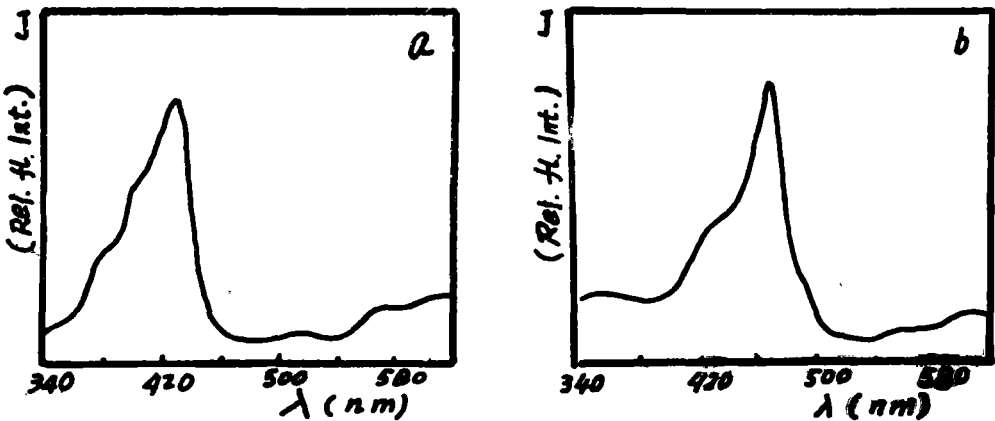


图 3. 叶绿素的选择激发的发光光谱

Fig. 3. Selective Excitation spectra of the chlorophyll

- a) 1. Chlb. $4 \times 10^{-6} \text{M}$. 丙酮溶液 b) Chla, b 丙酮溶液
2. Chla. $1.2 \times 10^{-5} \text{M}$. 丙酮溶液 $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{nm}$, 298k.

表 2. 不同浓度时，色素混合体中 Chla 发光效率的实验数据

η_A		C_b		
C_a		$1 \times 10^{-6} \text{M}$.	$1 \times 10^{-5} \text{M}$.	$1 \times 10^{-4} \text{M}$.
$1 \times 10^{-6} \text{M}$.		—	22.11	—
$1 \times 10^{-5} \text{M}$.		8.24	32.80	32.26
$1 \times 10^{-4} \text{M}$.		—	32.84	—

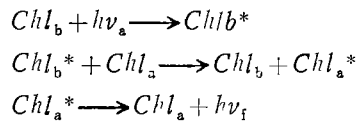
表中 η_A ：发光效率，表内数据为计算机给出的 Chla 的发光面积。
 C_a, C_b ：分别为 Chla, Chla 的浓度。

同时我们还测量了混合色素不同浓度情况下的荧光发射光谱, 当用 470nm 谱线光照时, 观察到固定一种色素浓度, Chla 的发光效率随另一种色素的浓度改变而改变。实验结果列于表 2。

讨 论

从图 3 的选择激发光谱中, 可以看到激发能量从 Chlb 转移到 Chla 的。因为光能是被 Chlb 而不是 Chla 所吸收, 或者说 Chla 吸收得很少, 但出现了 Chla 的强荧光, 没有 Chlb 的发光。说明被激发的 Chlb 分子将能量传给了 Chla, 在图 1 (b) 大豆叶绿体的发射光谱中, 还看到“天线”色素分子之间的能量效率是很高的。因为 Chla、b 对光的吸收是有选择的, 根据图 2 激发光谱, 我们选择如下四条谱带: 406nm 线对 Chla 有强吸收, Chlb 却很少吸收 (图 2 a); 470nm 线是 Chlb 的特征吸收带, Chla 几乎没有吸收 (图 2 b); 430nm 和 632.8nm (He—Ne 激光线) 谱线都是有效吸收带, 就是说我们选用了体内天线色素 Chla、b 各自的特征吸收带和二者都有效的吸收带去激发叶绿体, 结果只看到了 Chla 的强发光, 说明被激发的 Chla 或者 Chlb, 都将能量传递给 Chla, 使 Chla 发光, 完成了色素分子之间的能量传递过程。

上述激发能的传递之所以可能, 是由于电子跃迁时在电荷重新分布过程中所涉及的力的缘故: 色素体系里一个分子的电偶极子场引起另一个分子的激发 (Anders, 1979) 在这一偶联过程中具体地说 Chlb 激发伴随着电子受体分子 Chla 的激发传递过程可写作:



这里的 ν_a 和 ν_f 分别为吸收和发射的频率。Chlb 分子在传递能量之前先达到低的振动态, 而传递的能量相

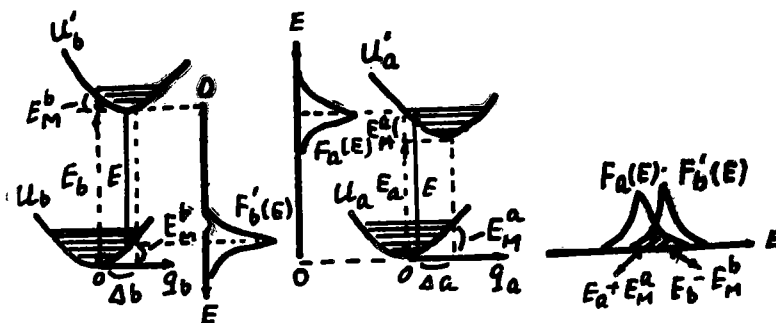


图 4. 声子参与下的共振能量传递模型图

这里: u_b 、 u'_b 、 u_a 、 u'_a 表示 Chlb 和 Chla 的基态与激发态能级。E_m 表示振动能级, $F_a(E)$ 、 $F_b(E)$ 表示 Chla、b 光谱重迭状态。

当于这些低激发振动态到基态的跃迁, 然后受体分子 Chla 才得到相同数量的能量。利用位形坐标模型, 可以把这种能量传递过程表示出来 (S. Yomosa, 1978)。

在大豆叶绿体色素之间的能量转移是分子间的能量转移, 是在规

定的分子链上进行的 (唐树延, 1984; 右卫、重雄, 1979) 在分子间转移时, Chla,

b 分子都独立的对吸收光谱作贡献。根据 Förster (1948) 原理, 从 D 到 A 的转移电子激发能正比于相互作用项:

$$E_D \bullet_A \cdot_{DA} = \langle \Psi_D \bullet \Psi_A | H | \Psi_D \Psi_A^* \rangle$$

如果我们只考虑一级近似, 只有偶极子-偶极子的相互作用。假定 D 和 A 的能级在相互作用时基本不变, 那么就可以得到这种作用产生的能量交换几率:

$$\begin{aligned} W &= \frac{J}{h} \cdot \frac{1}{\sigma_a \cdot \sigma_b} \int \exp \left\{ -\frac{1}{2\sigma_b^2} (E_b + E_M^b - E)^2 \right\} \\ &\quad \times \exp \left\{ -\frac{1}{2\sigma_a^2} (E_a + E_M^a - E)^2 \right\} dE \\ &= \frac{2\pi}{h} \cdot J^2 \cdot \left(\frac{1}{2\pi \cdot \sigma^2} \right)^{\frac{1}{2}} \exp \left\{ -\frac{(\Delta E - E_M)}{2\sigma^2} \right\} \end{aligned}$$

式中: J : 激发跃迁积分。 $E_M = E_M^b + E_M^a$

$$\Delta E = E_b - E_a$$

French (1969) 和 Yu. W. (1975) 利用共振模型, 根据 Förster 公式, 提出假体 $E_b - E_a = E_M^b + E_M^a$ 和 $E_b > E_a$ 的条件成立, 那么就存在共振传递。同时作者还计算了菠菜叶绿体光谱的 Stokes 位移平均值 $2E_M$ 约等于 0.2—0.3ev。

结合大豆, 用选择激发光谱 (图 3) 数据, 我们也计算了 $2E_M$ 平均值如下:

$$E_M^a = (E_{Chl_b} - E_{Chl_a}) \div 2 = (1.864 - 1.822) \div 2 = 0.021\text{ev.}$$

$$E_a = E_{Chl_a} + E_M^a = 1.822 + 0.021 = 1.843\text{ev.}$$

$$E_M^b = (K \cdot E_{470} - E_{Chl_b}) \div 2 = (0.795 \cdot 2.632 - 1.864) \div 2 = 0.120\text{ev.}$$

$$E_b = K \cdot E_{470} - E_M^b = 0.795 \cdot 2.632 - 0.120 = 1.985\text{ev.}$$

K : 表示样品对 470nm 谱线的吸收系数, 约等于 0.795, 代入假设条件:

$$E_b - E_a = 1.985 - 1.843 = 0.142\text{ev.}$$

$$E_M^b + E_M^a = 0.021 + 0.120 = 0.141\text{ev.}$$

计算结果验证了 Chl_a, b 分子中心吸收光谱差与激发态振动能级和, 二者基本相等, 其 $2E_M \approx 0.283\text{ev.}$ 与文献报导的结果 (French, 1969) 基本符合。结果表明上述过程具备有共振传递的基本条件。

至于共振传递的具体路线, 一般说不同分子体系是不同的。Schulman (1950) 曾以 $S \rightarrow A$ 共振传递路线为依据, 提出敏化发光效率 $\eta_A = [1 - (1 - C_A)^k]$ 的公式, 他认为 η_A 与 C_S 无关, 只随 C_A 增加而增加。这种主张与大豆色素体系的 Chl_a 浓度固定, 改变 Chl_b 浓度的实验结果不符 (见表 2)。实际上, Chl_a 浓度不变, η_A 随 Chl_b 浓度 (C_S) 提高而提高, 因此, 对于 Chl_a, b 之间共振能量传递的途径, 我们认为应该考虑下面的各种传递路线:

- a) $S \rightarrow A$
- b) $S \rightarrow S \rightarrow A$
- c) $S \dots S \rightarrow A$

提出 η_A 应是各种途径的共同贡献,

$$\eta_A = \sum_{i=1}^n \eta_{A(i)}$$

从这个表示中可以看到, 在 C_s 一定时, η_A 随 C_A 增加而增加; 当 C_A 一定时, η_A 随 C_s 增加而增加。定性地说这种解释与表 2 的实验结果相符合。

总之, 共振理论能够解释光合作用过程中目前所有已观察到的能量传递现象 (梅镇安, 1976; Govindjee, 1982; Loach 等, 1973)。而且随着对共振理论和现象研究的广泛和深入, 它在光合作用能量传输过程中的作用也愈加显得重要。

参 考 文 献

- [1] 苗以农、唐树延等, 1982, 《吉林农业科学》№ 4. 27—29
- [2] 梅镇安, 1976, 《光合作用研究进展》(科学出版社) I. 161—171.
- [3] 梅镇安, 1981, 《生物化学与生物物理进展》(科学出版社) 1. 4—10.
- [4] 杨善元, 1979, 《化学通报》№ 3. 36—40.
- [5] 唐树延等, 1982, 《发光与显示》№ 3. 41—45.
- [6] 唐树延等, 1984, 《光合作用研究进展》(科学出版社) II. 74—82.
- [7] 右卫门佐重雄等, 1979, 《光生物学》上, 143—152.
- [8] Anders., 1979. App. Phys. 18. 333.
- [9] Barber, J., 1978. Reports on progress in physi. 41. 1157—1199.
- [10] Campillo, A. J. et al., 1956, J. Biophys. 16. 93.
- [11] Forsler, Th. 1984. Ann. Physics. 2. 55. 1949. Z. Electrochem. 53. 93.
- [12] French, C. S. et al., 1969. Carnigie Inst. year book. 69. 662.
- [13] Govindjee. 1982. Photosynthesis. Vol. I. 499—512.
- [14] Hall, D. et al., 1975. Lab. manual. of cell biol. 148—150.
- [15] Katz, J. J. et al., 1973 "Current Topics in Bioenergetics." 5. 41—75. Acad. press. New york. N. Y.
- [16] Loach, P. et al., 1973. Photochem. photobiol. 17. 195.
- [17] Norris, J. R. et al., 1974. proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71. 4897—4900.
- [18] Porter, G. et. al., 1978. BBA. 501. 232—246.
- [19] Schulman, J. H. 1950. J. Electrochem. Soc. 97. 123.
- [20] Sigeo yomosa, 1978. J. phys. society of Japan. 45. 3.
- [21] Yu. w. et al., 1975. BBA. 387. 157.

ENERGY TRANSFER BETWEEN PIGMENTS CHL A, B IN PHOTOSYNTHESIS OF SOYBEAN

Tang Shuyan Meng Jiwu,

(Changchun Institute of Physics, Academia Sinica)

Yang Wenjie Miao Yinong,

(Biology Department, Northeast Normal University)

Abstract

We had studied systematically the interaction between pigment molecules.

The absorption, emission and excitation spectra are measured. The energy transfer from chl_b to chl_a under the excitation by wavelength of 470nm at room temperature was observed. It is a process of radiationless energy transfer. We discuss also this energy transfer process by means of the model of configuration coordinates.

编 余

大豆科技工作者：本刊为及时报导全国大豆科技单位及所组织的各种形式的学术活动，广泛交流新技术、新成果，掌握学术动态，请将您所安排的活动，预先通知我们，以便进行联系和采访，丰富本刊的报导内容，谢谢大家的支持。

• 编者 •