УДК 581.132:58.035

А. Т. Черноколев (Болгария), А. К. Кукушкин, М. К. Солнцев

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ, СВЯЗАННЫХ С ПЕРЕНОСОМ ЭЛЕКТРОНА В ХЛОРОПЛАСТАХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ, МЕТОДОМ ТЕРМОВЫСВЕЧИВАНИЯ

Введение. В 1957 г. Арнольд и Шервуд [1], замораживая высечки зеленых листьев, а затем облучая и нагревая образцы, получили 4 пика термолюминесценции (ТЛ) —158, —9, +27 и +49° С, обозначенные ими Z, A, B и C соответственно. С тех пор до настоящего времени была исследована термолюминесценция разных фотосинтезирующих объектов — целых листьев и хлоропластов [2—9]. Сравнение результатов, полученных разными исследователями, показывает примерное совпадение температур пиков ТЛ, обозначенных в [7]: Z_{γ} -пик (—160° С), A-пик (—10° С), B₁-пик (+25° С), B₂-пик (+40° С) и C-пик (+55° С). Большинство авторов [3—9] считают, что при поглощении квантов света происходит разделение зарядов, вследствие чего образуются окисленные и восстановленные электронные эквиваленты. Их рекомбинация при нагревании приводит к излучению света.

Однако до сих пор точно не установлена природа соответствующих рекомбинирующих эквивалентов. Некоторые авторы [3—5] считают, что за пики ответственна фотосистема II (ФСІІ). Причем обратный перенос электронов происходит с восстановленных переносчиков между фотосистемами [3]. Другие авторы [6] полагают, что за обратные реакции переноса электрона, приводящие к ТЛ, ответственна также ФСІ. Исходя из того что для возбуждения пиков А и В нужны два кванта, Арнольд и Аззи [4] предложили полупроводниковую модель, в которой ТЛ происходит в ФСІІ вследствие рекомбинации свободных дырок и электронов. Ичикава с соавт. [7—9] связывают ТЛ с кислородовыделяющей способностью ФСІІ.

В настоящей работе нами сделана попытка выяснить природу восстановленных электронных эквивалентов, ответственных за ТЛ в хлоропластах высших растений.

Методика. Описание установки для изучения ТЛ подробно приведено в работе [10]. Источником непрерывной подсветки служила лампа КГМ-30-300 (доза — 20 Вт/м²). Измерение мощности падающего света выполнено с помощью прибора ИМО-2. Спектральные характеристики пиков ТЛ получены с помощью стеклянных и интерференционных светофильтров. При снятии спектров возбуждения пиков ТЛ A и B учитывались спектральные характеристики лампы, интерференционных светофильтров и светоприемника (ФЭУ-38).

Фотосинтезирующими объектами для исследования служили хлоропласты бобов (сорт «Русские черные»). Методика выделения хлоропластов описана в работе [11]. Хлоропласты выделяли из 15—20 дневных проростков, выращенных при дневном освещении, и хранили их в темноте при температуре 0° С. Хлоропласты использовались в течение трех дней. Обычно используемые концентрации хлорофилла были 1 кг/м³. Стандартный опыт проводили следующим образом. Образец 0,2 мл суспензии хлоропластов помещали ровным слоем на держатель криостата, после чего образец выдерживали в темноте в криостате в течение четырех минут. Затем хлоропласты охлаждали с помощью жидкого азота до желаемой температуры. При —30° С включали форвакуумный насос, который создавал в криостате вакуум 13,3 Па. Образец облучали 2 минуты, а затем быстро охлаждали до температуры жидкого азота (давление падало до 2,55 Па). Нагрев образца производили с постоянной скоростью 38 град мин⁻¹. При температуре —30° С форвакуумный насос выключали и давление воздуха в криостате доводили до атмосферного.

Было получено, что пик A достигает стационарного значения (насыщается) при времени облучения 2 мин, а пик B — при времени облучения 50 с. Поэтому стандартный опыт проводили со временем облучения 2 мин для того, чтобы все пики были насыщены. Спектр возбуждения пика A получали при времени облучения 1 мин, а пика B — 30 с. При изучении влияния дихлорфенилметилмочевины (диурона).



Рис. 1. Кривая ТЛ, полученная при облучении хлоропластов белым светом

дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ), а также смеси ферри- и ферроцианида к 0,2 мл суспензии хлоропластов добавляли 0,1 мл раствора, содержащего необходимые добавки.

Измерение окислительно-восстановительных потенциалов раствора смеси ферри- и ферроцианида производили с помощью платинового электрода относительно хлорсеребряного на pH-метре ЛПУ-01, работающем в режиме милливольтметра. Все значения окислительно-восстановительных потенциалов, приведенные при обсуж-

дении результатов, даны относительно водородного электрода при pH = 7.

Результаты и обсуждение. При одновременном освещении и охлаждении от комнатных температур до —196°С, а также при облучении при —30°С, а потом при —196°С мы, как и в работе [7], получили 5 пиков ТЛ с температурами максимумов $(T_{\rm M})$: —165, —10, +25, +35 и +55°С (рис. 1). Обозначим их, как и в работе [7], соответственно $Z_{*,}$ A, B_1, B_2 (когда B_1 и B_2 плохо разрешимы, обозначаем их через B) и C_4 Нужно отметить, что пики B_2 и C иногда проявлялись в виде очень слабых плеч. У нас так же, как и у других авторов [7], эти пики примерно совпадали по $T_{\rm M}$ с пиками ТЛ, полученными на высечках целых листьев. Температура облучения —30°С была выбрана экспериментально для того, чтобы все пики, кроме, естественно, Z_* , были хорошо выражены (см. рис. 1, 4). В дальнейшем все результаты были получены при температуре облучения —30°С. Считается, что пик Z_* не связан с процессами фотосинтеза [1, 6]. Мы получили спектр возбуждения пика Z_* . В литературе [6] в последнее время можно встретить данные, что пик Z_v возбуждается и красным светом, а не только синим [1, 2]. Нами получено, что этот пик возбуждается синим светом с длиной волны от 400 до 500 нм. Свечение при 50—60° С мы не исследовали, так как известно, что при этих температурах происходит разрушение интактной структуры фотосинтетического аппарата.

Спектры возбуждения пика A и пика B (рис. 2 и 3) показывают, что оба пика возбуждаются преимущественно светом с длиной волны $\lambda < 700$ нм (поглощаемым в основном ФСІІ). Важно отметить, что пик A почти не возбуждается светом с длиной волны $\lambda > 700$ нм (поглощаемым в основном ФСІ), сколько бы мы не увеличивали время облучения, тогда как пик B значительно возрастает, если увеличивать время облучения при $\lambda > 700$ нм. Причина такого поведения пика Bпока не ясна. Кроме того, нами бы-

ло получено, что спектры излучения как пика A, так и пика B близки к спектру флуоресценции хлорофилла при низких температурах [12].



Рис. 2. Спектр возбуждения ТЛ ника A. S_{λ} — светосумма ТЛ, нормированная на количество падающих квантов (λ длина волны)



Рис. 3. Спектр возбуждения ТЛ пика B. S_{λ} — светосумма ТЛ, ногмированная на количество падающих квантов (λ — длина волны)

В дальнейшем, при интерпретации наших результатов будем исходить из гипотезы [3], согласно которой разным пикам ТЛ соответствуют обратные реакции с разных восстановленных переносчиков в цепи электронного переноса между двумя фотосистемами. Причем пику с более низкой $T_{\rm M}$ (меньшая энергия активации) соответствует переносчик где-то в начале цепи с более низким окислительно-восстановительным потенциалом. И наоборот, пику с более высокой $T_{\rm M}$ (большая энергия активации) соответствует переносчик где-то в конце цепи электронного переноса с более высоким окислительно-восстановительным потенциалом.

На рис. 4 показана зависимость светосуммы ТЛ для пиков A и B от температуры облучения. При — 30° С хорошо выражены все пики, возможно, потому, что при этой температуре цепь электронного транспорта еще не совсем прервана и происходит восстановление как первичных акцепторов электронов, так и вторичных [13]. Причем восстанавливаются не все вторичные акцепторы в цепи электронного транспорта между двумя фотосистемами, а только до определенного места [13]. Дальше цепь электронного транспорта остается пустой, без электронов. При нагреве такого образца цепь начинает работать. Электроны с вторичных акцепторов идут сначала вниз до конца пустой цепи, откуда и происходит обратный перенос электронов, ответственных за излучение квантов ТЛ пика В. Одновременно происходит и обратный перенос электрона с первичных акцепторов, ответственный за излучение квантов ТЛ пика А. При нагреве образца электроны с первичных акцепторов не могут сразу спуститься вниз по цепи электронного транспорта из-за восстановленности близких вторичных акцепторов.



Рис. 4. Зависимость светосуммы ТЛ пиков А и В от температуры облучения

Полученным нами нескольким пикам ТЛ соответствует несколько восстановленных переносчиков. Это значит, что в отдельной цепи элек-



Рис. 5. Зависимость ТЛ от окислительно-восстановительного потенциала среды (+310 мВ). 1 контрольный опыт (0,2 мл суспеизии хлоропластов плюс 0,1 мл H₂O), 2 — суспензия хлоропластов с добавкой водного раствора ферроцианида

тронного транспорта между двумя фотосистемами находится более одного электрона. Им соответствует такое же число положительных зарядов, с которыми они могут рекомбинировать с испусканием квантов света ТЛ.

Если температура понижается от -30° С до -60° С, интенсивность пика A уменьшается до нуля. Это происходит за счет того, что с понижением температуры постепенно прерывается цепь электронного транспорта и при -60° С электроны попадают только на первичные акцепторы [13]. При последующем нагревании цепь электронного транспорта начинает работать и электроны, как уже отмечалось, спускаются вниз до конца цепи, откуда и происходят обратные реакции, ответственные за пик B. Поэтому температурная зависимость светосуммы пика B отражает состояние первичного акцептора ФСИ. Хорошо видно, что восстановление первичного акцептора идет даже при температурах жидкого азота. Уменьшение интенсивности пиков A и B при увеличении температуры облучения объясняется послесвечением.

Действие ингибитора электронного транспорта диурона подтверждает вышеизложенную гипотезу относительно природы восстановлен-

30

эквивалентов, ответственных за ТЛ. Диурон в концентрации ных $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л сдвигает пик B к новому положению с $T_{\rm M} = +11^{\circ}$ C. Подобное действие диурона уже отмечалось ранее [3, 7]. Известно, что диурон прерывает электронный поток в цепи электронного транспорта между фотосистемами [14]. Это приводит к восстановлению только тех переносчиков, которые находятся в областях до места действия ингибитора и которые ответственны за пики ТЛ с более низкой Тм.

Раствор ферроцианида концентрации 5.10⁻³ моль/л с окислительно-восстановительным потенциалом +310 мВ увеличивал светосумму пика В и уменьшал светосумму пика А (рис. 5). Причем на сколько увеличивается пик В, на столько уменьшается пик А. Эквимолярная смесь растворов ферри- и ферроцианида концентрации 5.10-3 моль/л с окислительно-восстановительным потенциалом +410 мВ уменьшает светосумму пиков A и B_1 , но увеличивает светосумму пика B_2 . Раствор феррицианида концентрации 5.10-3 моль/л с окислительно-восстановительным потенциалом +600 мВ уменьшал светосумму пиков A и B практически до нуля.

ДХФИФ концентрации 3·10⁻³ моль/л уменьшал почти до нуля светосумму пиков А и В. Смесь растворов ДХФИФ концентрации 5.10-3 моль/л с равным количеством раствора аскорбиновой кислоты концентрации 6 10-4 моль/л уменьшала до нуля светосумму только пика В. Одна аскорбиновая кислота почти не изменяла пика А и В. Раствор ДХФИФ концентрации 5.10-3 моль/л в присутствии избытка аскорбиновой кислоты концентрации 2,5 10-2 моль/л тоже почти не изменял пики А и В.

Авторы выражают благодарность Л. А. Блюменфельду и А. Н. Тихонову за полезные дискуссии при обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Агпоld W., Sherwood H. "Proc. Natl. Acad. Sci.", 1957, 43, 105.
 Шувалов В. А., Литвин Ф. Ф. «Молекулярная биология», 1969, 3, 59.
 Рубин А. Б., Венедиктов П. С. «Биофизика», 1969, 14, 105.
 Агпоld W., Azzi J. "Photochem. Photobiolog.", 1971, 14, 233.
 Lurie S. Bertsch W. BBA, 1974, 357, 420.
 Desai T. S., Sane P. V., Tatake V. G. "Photochem. Photobiol.", 1974, 21, 345.
 Ichikawa T., Inoue Y., Shibata K. "Biochim Biophys Acta", 1975, 408, 228.
 Inoue Y., Furuta S., Oku T., Shibata K. "Biochim. Biophys Acta", 1976, 448, 357.
- 448, 357. 9. Inoue Y., Oku T., Furuta S., Shibata K. "Biochim., Biophys Acta", 1976,
- 440, 772.

- 10. Гайслер Ф. Диплом. работа. М., 1975. 11. Тихонов А. Н. Канд. дис. М., 1974. 12. Bordman N. K., Thorne S. W., Anderson J. M. "Proc. Natl. Acad. Sci.", 1966, 56, 586.
- Joliot A. "Biochim. Biophys Acta", 1974, 357, 439.
 Bishop N. I. "Biochim. Biophys Acta", 1958, 27, 205.

Кафедра биофизики

Поступила в редакцию 11.11.77