

БИОФИЗИКА

УДК 577.3

**ИЗУЧЕНИЕ МЕДЛЕННОЙ ИНДУКЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ЛИСТЬЕВ
ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ, ВЫРАЩЕННЫХ В РАЗНЫХ СВЕТОВЫХ
УСЛОВИЯХ, А ТАКЖЕ В ПРИСУТСТВИИ ХИМИЧЕСКИХ
АГЕНТОВ—АНТИМИЦИНА А И NH_4Cl**

И. О. Белогрудов, В. А. Караваев, А. К. Кукушкин

(кафедра биофизики физического факультета)

Индукционные изменения флуоресценции, возникающие при возбуждении адаптированных к темноте фотосинтезирующих объектов светом средней интенсивности, изучаются более 50 лет [1, 2]. Интерес к этому вопросу обусловлен его принципиальной важностью для понимания механизмов первичных процессов трансформации энергии солнечного света в высокоэнергетические связи продуктов фотосинтеза.

Флуоресценция, будучи конкурентным по отношению к фотосинтезу путем преобразования энергии возбуждения светособирающих пигментов, является индикатором тех фотофизических и фотохимических превращений, которые происходят не только в световых, но и в темновых процессах фотосинтеза; она способна адекватно изменяться под действием целого ряда внешних и внутренних факторов. При включении возбуждающего света интенсивность флуоресценции претерпевает ряд быстрых и медленных изменений. Быстрая индукция (характерные времена — секунды) определяется изменениями окислительно-восстановительного состояния первичного акцептора электронов фотосистемы-2 (ФС-2). Медленная индукция (характерные времена — минуты) до сих пор однозначного объяснения не имеет. В ее основе могут лежать следующие механизмы: перераспределение энергии возбуждения между фотосистемами за счет латеральной диффузии части светособирающих комплексов при их фосфорилировании [3]; изменение редокс-состояния переносчиков в цепи электронного транспорта между фотосистемами [4]; конформационные изменения мембран при фотофосфорилировании [5, 6], изменения в ходе биохимических реакций цикла Кальвина [7].

Данные по зависимости медленной индукции флуоресценции от различных факторов представляют значительный интерес как с точки зрения более глубокого изучения природы медленной индукции, так и с позиций возможности использования этого явления для оценки физиологического состояния фотосинтезирующих объектов и изучения механизмов регуляции фотосинтетического аппарата. Показано, что медленная индукция существенно зависит от возраста растений [8, 9], условий выращивания [10, 11], газового состава окружающей среды [12, 13], температуры [14, 15], предыстории объекта (время темновой адаптации, предварительное освещение [4]), добавок различных химических агентов [16, 17] и т. д.

Информацию о механизмах медленной индукции флуоресценции можно получить, исследуя ее в присутствии химических агентов с известным избирательным действием (ингибиторов электронного транспорта, кофакторов циклического потока электронов и др.). Одной из целей настоящей работы было изучение действия на медленную индукцию флуоресценции листьев бобов антимицина А и NH_4Cl . Анти-

мицин А известен как ингибитор циклического потока электронов вокруг фотосистемы-1 (ФС-1) [18, 19]; NH_4Cl — как разобщитель электронного транспорта и фотофосфорилирования [20, 21]; ранее изучалось их влияние на медленную индукцию флуоресценции хлоропластов и модельных систем [18—21], действие их на индукцию интактных листьев анализировалось недостаточно подробно [7].

Перспективным подходом в исследованиях фотосинтеза является изучение различных характеристик растений, выращенных в строго контролируемых условиях при варьировании одного из параметров среды (температура, освещенность, газовый состав и т. д.). Установление корреляции между флуоресцентными и биометрическими показателями растений, выращенных в разных световых условиях, а также изучение изменений параметров медленной индукции флуоресценции для этих растений было второй целью данной работы.

Методика и объекты исследований. Во всех опытах использовали листья бобов *Vicia faba* (сорт «Русские черные»).

Для изучения действия химических агентов растения выращивали в земле при комнатной температуре и смене периодов освещения и темноты, близкой к естественной. Освещение проводилось лампами накаливания общей мощностью 300 Вт с расстояния 40—50 см. Использовались листья 10—20-дневных проростков бобов преимущественно с двух нижних ярусов растений.

Введение в листья растворов химических агентов осуществляли с помощью медицинского шприца. Заполнение межклеточного пространства раствором по всей площади листа контролировали визуально.

Свежий лист срезали с растения, сразу вводили соответствующий раствор в жилку и в течение 1 мин выдерживали в фильтровальной бумаге для удаления влаги с поверхности, после чего помещали в держатель установки, который устанавливался в камере с окнами для возбуждения и регистрации флуоресценции. В камере лист адаптировали к темноте в течение 5 мин, затем регистрировали медленную индукцию флуоресценции; время индукции не превышало 3 мин. После этого лист вновь адаптировали к темноте в течение 3 мин и вновь регистрировали медленную индукцию; время индукции не превышало 2 мин. Вновь 5 мин адаптации и 2 мин индукции, еще 10 мин адаптации и 3 мин индукции. Продолжительность освещения определялась временем выхода кривой индукции на стационарный уровень. В общей сложности лист находился в держателе 33 мин.

В опытах по изучению влияния разных световых условий при росте растений на параметры медленной индукции бобы выращивали в специальной камере, в земле, при освещении люминесцентными лампами. Бобы росли в трех секциях при разных интенсивностях падающего света: 2,4 Вт/м² (1-я секция); 3,4 Вт/м² (2-я) и 4,2 Вт/м² (3-я секция) в режиме 8 ч света — 16 ч темноты. Температура воздуха в соответствующих секциях была при этом на уровне почвы 22; 23,3 и 24,2°C; на уровне 25 см от почвы (что приблизительно соответствует 3-му ярусу листьев) — 24,5; 25,2 и 26,1°C. Лист срезали с растения, сразу помещали в держатель, адаптировали к темноте в течение 5 мин и регистрировали индукцию флуоресценции.

Для приготовления раствора NH_4Cl (марки ХЧ) использовали дистиллированную воду, антимицина А (фирмы «Serva», ФРГ) — этанол, причем содержание этанола в конечном растворе было равно 1%.

При исследовании действия химических веществ в качестве контроля для NH_4Cl использовали дистиллированную воду, а для антимицина А — дистиллированную воду и 1%-ный раствор этанола.

Источником возбуждающего флуоресценцию света во всех опытах служила осветительная система диапроектора ЛЭТИ-55 с широкополосным фильтром СЗС-22 ($\lambda_{\max} = 450$ нм) и нейтральными фильтрами НС-6÷8. Регистрирующая система состояла из последовательно расположенных монохроматора СФ-4, ФЭУ-79, усилителя и самописца КСП-4. Постоянная времени установки не превышала 0,2 с.

Результаты и обсуждение.

Введение раствора NH_4Cl концентрации $10^{-3} \div 10^{-2}$ М (рис. 1) в жилку листа приводит к изменению формы кривой медленной индукции по сравнению с контрольной. Это изменение заключается главным образом в возрастании величины второго максимума F_M и проявляется преимущественно после второго и третьего периодов темновой адап-

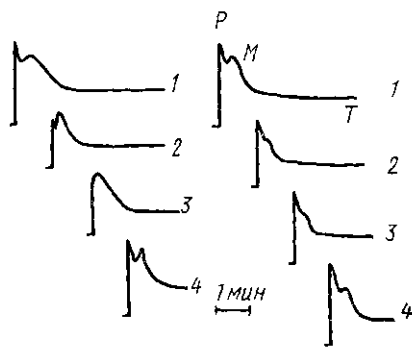


Рис. 1. Изменения медленной индукции флуоресценции листьев бобов в присутствии NH_4Cl концентрации 10^{-3} М (слева) и H_2O (справа). Время темновой адаптации 5 (1); 3 (2); 5 (3) и 10 мин (4). Интенсивность возбуждающего флуоресценцию света $27,7 \text{ Вт/м}^2$

тации (см. рис. 1, кривые 2, 3). Отмеченный эффект при слабых ($13,3 \text{ Вт/м}^2$) и сильных ($83,1 \text{ Вт/м}^2$) интенсивностях в случае малых концентраций NH_4Cl ($(0,5 \div 1) \cdot 10^{-3}$ М) отсутствует и появляется при этих интенсивностях с ростом концентрации NH_4Cl (от $5 \cdot 10^{-3}$ М).

Согласно литературным данным [20, 21], действие NH_4Cl на фотосинтетический аппарат листьев растений имеет многоплановый характер. В опытах с хлоропластами [21] показано, что NH_4Cl увеличивает скорость электронного транспорта; скорость фотофосфорилирования при этом увеличивается при малых и уменьшается при больших концентрациях NH_4Cl .

В работе [22] отмечено изменение скоростей циклического и нециклического фотофосфорилирования в присутствии NH_4Cl , причем соотношение этих скоростей существенно зависело от интенсивности возбуждающего света. Большие концентрации NH_4Cl , как известно, нарушают электронный поток на донорной стороне ФС-2 [23]. Таким образом, наблюдаемые изменения индукции флуоресценции листьев в присутствии NH_4Cl (см. рис. 1) указывают на существенную зависимость переходной кинетики флуоресценции на участке $F_P - F_T$ от скоростей циклического и нециклического электронного транспорта и состояния аденилатной системы хлоропластов.

Действие на кинетику медленной индукции флуоресценции антимицина А проявляется начиная с концентрации 10^{-5} М и заключается в значительном подъеме стационарного уровня флуоресценции F_T и увеличении времени достижения F_T по сравнению с контрольным (рис. 2). Этот результат хорошо согласуется с представлением об антимине А как ингибиторе циклического электронного транспорта вокруг ФС-1 [18, 19]: с выключением циклического транспорта электронов падает скорость фотофосфорилирования, замедляется отток восстановленных фотопродуктов от ФС-1 и работа цикла Кальвина (вследствие уменьшения количества АТФ), а также уменьшается фос-

форилирование белков светособирающих комплексов, что препятствует переносу энергии от ФС-2 к ФС-1 по механизму *spillover*. Совместное действие перечисленных факторов приводит к задержке тушения флуоресценции, проявляющейся в увеличении времени спада флуоресценции и подъеме стационарного уровня F_T .

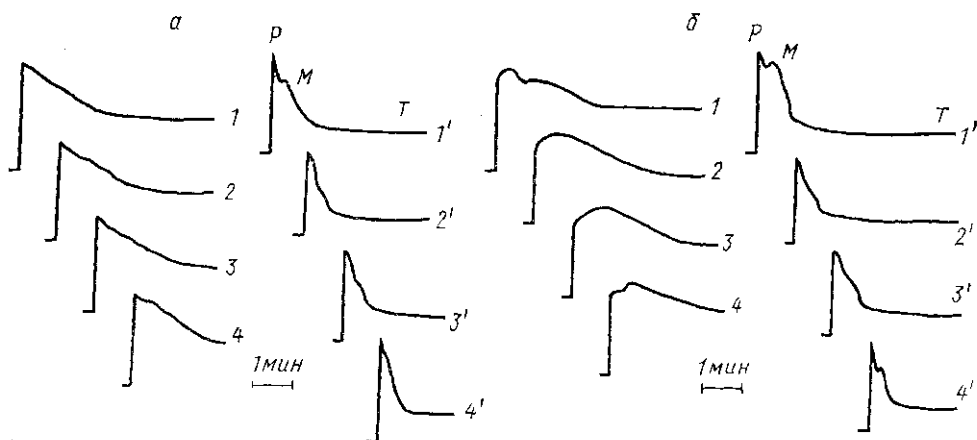


Рис. 2. Изменения медленной индукции флуоресценции листьев бобов в присутствии антимицина А концентрации 10^{-3} М. Интенсивность возбуждающего флуоресценцию света 27,7 (а) и 13,3 Вт/м² (б). Время темновой адаптации: 5 (1), 3 (2), 5 (3) и 10 мин (4). Цифрами со штрихами отмечены контрольные кривые: с H₂O (а) и 1%-ным раствором этанола (б)

В опытах с растениями, выращенными в разных световых условиях, в качестве параметра медленной индукции флуоресценции было взято отношение F_M/F_T величины второго максимума F_M к величине стационарного уровня флуоресценции F_T . Характерные кривые медленной индукции флуоресценции листьев бобов с первого яруса растений, выращенных в разных световых условиях, представлены на рис. 3. Для листьев, в основном закончивших свой рост, было обнаружено возрастание значений F_M/F_T с ростом интенсивности света, на котором выращивалось растение; та же закономерность наблюдается и для основных

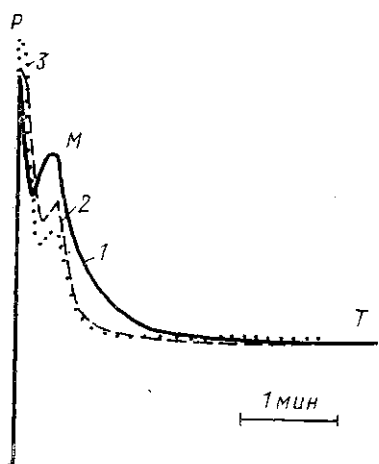


Рис. 3. Характерные кривые медленной индукции флуоресценции листьев бобов, выращенных в разных световых условиях. Интенсивность света при выращивании: 4,2 (1), 3,4 (2), 2,4 Вт/м² (3). Интенсивность возбуждающего флуоресценцию света 27,7 Вт/м²

биометрических показателей: веса растения, длины стебля и листьев (таблица).

Размеры листа и растения в целом характеризуют степень развития фотосинтетического аппарата, которая является одним из наиболее важных показателей фотосинтетической продуктивности растений

**Флуоресцентные и биометрические показатели растений бобов,
выращенных в разных световых условиях**

Интенсивность света, Вт/м ²	№ яруса листьев	F_M/F_T	Длина листа, мм	Длина стебля, см	Вес растения, г
2,4	1	2,03±0,06	35,9±1,1	23,8±1,4	2,94±0,02
	2	2,08±0,11	39,2±0,9		
	3	2,39±0,12	30,1±1,3		
3,4	1	2,23±0,07	41,1±1,0	30,8±1,3	3,83±0,02
	2	2,27±0,10	41,6±0,8		
	3	2,29±0,10	32,2±1,1		
4,2	1	2,32±0,07	41,2±1,0	32,3±1,5	4,34±0,02
	2	2,35±0,12	40,8±0,09		
	3	2,05±0,12	33,3±1,2		

[24]. Большие значения биометрических параметров указывают на большую фотосинтетическую активность листьев растений, выращенных на более сильном свете, поскольку фотосинтез является предпосылкой роста. Таким образом, однонаправленные изменения флуоресцентных и биометрических показателей для листьев первых двух ярусов, очевидно, свидетельствуют о связи индукционных переходов флуоресценции, в частности тушения на участке $F_M - F_T$, с функциональной активностью фотосинтетического аппарата и подтверждают содержащийся в работах [25, 26] вывод о корреляции переменной флуоресценции с фотосинтетической активностью листьев.

Листья самого верхнего, третьего яруса к моменту проведения флуоресцентных и биометрических измерений еще не закончили свой рост; при этом возраст их был различным: на более сильном свете развитие проростков происходило быстрее. Как видно из таблицы, для листьев третьего яруса наблюдается обратная закономерность: с увеличением интенсивности света при выращивании размер листа увеличивается, а F_M/F_T уменьшается. Этот факт хорошо согласуется с данными [27], где показано, что для данного времени темновой адаптации (5 мин) переменная флуоресценция молодых листьев «разгорается» в большей степени, чем флуоресценция зрелых.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения метода медленной индукции флуоресценции для качественной и количественной оценки структурно-функционального состояния фотосинтетического аппарата в интактных листьях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Рабинович Е. Фотосинтез. М. 1959. Т. 3. [2] Govindjee, Parageorgiou G.//Photophysiology. 1971. 6, N 1. P. 1—14. [3] Horton P.//FEBS letters. 1983. 152. P. 47—52. [4] Andreeva A. S.//Photosynthetica. 1983. 17, N 4. P. 515—522. [5] Barber J.//ANN. Rev. Plant. Physiol. 1982. 33. P. 261—295. [6] Weber A. N., Baker N. R., Platt-Aloia K., Thomson W.//Physiol. plant. 1984. 60. P. 171—179. [7] Walker D. A.//Planta. 1981. 153. P. 273—278. [8] Кикнадзе Г. С.//Физиология растений. 1971. 18, N 1. С. 215—218. [9] Нестеренко Т. В., Сидько Ф. Я.//Там же. 1985. 32, N 3. С. 440—444. [10] Караваяев В. А., Павлова И. Е., Кукушкин А. К.//Там же. 1978. 25, N 4. С. 798—802. [11] Schreiber U., Fink R., Vidaver V.//Planta. 1977. 133. P. 121—129. [12] Ogawa T.//Biochim. Biophys. Acta. 1982. 681. P. 103—109. [13] Григорьев Ю. С., Гольд В. М., Гаевский И. А., Белоног Н. П.//Физиология растений. 1973. 20. С. 747—752. [14] Hetherington S. E., Smille R. M., Malagamba S., Huaman Z.//Planta. 1983. 159. P. 119—124. [15] Ireland G. R., Long S. P., Ва-

ker N. R.//Planta. 1984. 160. P. 550—558. [16] Караваев В. А., Шагурина Т. Л., Кукушкин А. К., Солицев М. К.//Изв. АН СССР, сер. биол. 1985, N 3. С. 458—461. [17] Рощина В. В., Кукушкин А. К.//Биохимия. 1984. 49, N 7. С. 1121—1126. [18] Риске Дж.//Механизм действия антибиотиков/Ред. Г. Ф. Гаузе. М. 1969. [19] Arnon D. I.//Experientia. 1966. 32, N 273. P. 1—15. [20] Crofts A. R. et al.//Biochim. Biophys. Acta. 1983. 723. P. 202—218. [21] Тимошин А. С. Дис. ... канд. физ.-мат. наук. М. (МГУ), 1984. [22] Иванченко В. М., Избавителей С. П., Маршакова М. Н.//Изв. АН БССР, сер. биол. наук. 1984. № 1. С. 28—34. [23] Slovacek R. E., Vannister T. T.//Biochim. Biophys. Acta. 1973. 325. P. 114—121. [24] Тарчевский И. А., Андрианова Ю. Е.//Физиология растений. 1980. 27, № 2. С. 341—347. [25] Бухов Н. Г., Карапетян Н. В., Воскресенская Н. П.//Там же. 1983. 30, № 5. С. 938—943. [26] Карапетян Н. В.//Успехи современной биологии. 1977. 83, № 3. С. 370—386. [27] Караваев В. А., Кукушкин А. К., Шагурина Т. Л., Солицев М. К.//Физиология растений. 1985. 32, № 2. С. 274—279.

Поступила в редакцию
10.04.86

ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 3, ФИЗИКА. АСТРОНОМИЯ. 1987. Т. 28. № 4

ФИЗИКА ТВЕРДОГО ТЕЛА

УДК 541.14:535.217

ЛАЗЕРНОЕ НИКЕЛИРОВАНИЕ ПОЛУПРОВОДНИКОВ

А. А. Еременко, В. В. Заддэ, А. К. Зайцева, Е. К. Козлова,
А. И. Портнягин, А. Н. Романченко, А. Е. Филиппов

(кафедра общей физики и волновых процессов)

Исследования, описанные в работах [1, 2], свидетельствуют о том, что действие лазерного излучения на систему «металл—раствор» приводит к значительному ускорению электрохимических процессов. Причина этого эффекта связана прежде всего с локальным нагревом поверхностной области раствора. Обнаружено, что увеличение скорости химического процесса сопровождается внутренней упорядоченностью осадка.

Данная работа посвящена исследованию особенностей протекания автокаталитической реакции восстановления никеля при лазерном воздействии на систему «полупроводник—раствор».

Эксперименты по оптическому никелированию полупроводников проводились по следующей схеме. В кварцевую кювету ($2 \times 5 \times 10$ см) с рабочим раствором, состав которого приведен в работе [3], помещались на расстоянии 1—2 мм от переднего окна кюветы кремниевые образцы (толщиной 0,1—0,5 мм и площадью 0,5—20 см²). Через окно кюветы на образец направлялся луч лазера диаметром 0,5—5 мм. В качестве образцов использовались пластины *p*-кремния, *n*-кремния, а также пластины с диодной структурой (с *p*—*n* переходом) — фотопреобразователи. Их внешний вид показан на рис. 1. Основной объем образца (база) был легирован бором (*p*-сторона), тонкий поверхностный слой толщиной 5 мкм дополнительно легирован фосфором (*n*-сторона). Глубина залегания *p*—*n* перехода — 0,8 мкм. В качестве источника оптического излучения использовался YAG:Nd³⁺-лазер ($\lambda = 1,06$ мкм), средняя мощность которого изменялась от 5 до 100 Вт.

Спектрометрические измерения показали, что слой стандартного раствора для химического никелирования толщиной 1—2 мм пропускает до 70% оптического излучения с длиной волны $\lambda = 1,06$ мкм. Для сравнения: пластины кремния *n*-типа толщиной 0,5 мм пропускали