

Н. В. КАРАПЕТЯН, В. В. КЛИМОВ, И. Н. КРАХМАЛЕВА
член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ

ИНДУКЦИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОПЛАСТОВ И ХРОМАТОФОРОВ В ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

При освещении зеленых листьев наблюдаются сложные по кинетике изменения флуоресценции ($\Delta\Phi$), известные под названием индукции флуоресценции (^{1, 2}). Быстрые $\Delta\Phi$ зеленых листьев можно связать с окислительно-восстановительными превращениями вещества Q , которое в окисленном состоянии тушит флуоресценцию (Φ) хлорофилла (³). Работами ряда авторов показано, что отдельные компоненты сложной кинетической кривой индукции Φ обусловлены взаимодействием первичного акцептора Q фотосистемы 2 с донорной частью этой же фотосистемы и с фотосистемой 1 через цепь переноса электрона (⁴⁻⁶).

Нами было показано (⁶), что промежуточный спад $I-D$ в кинетике $\Delta\Phi$ (⁷), а также уменьшение Φ при освещении светом 1 ($\lambda > 710$ м μ ; $1,2 \cdot 10^6$ эрг·см⁻²·сек⁻¹) листа в анаэробных условиях наиболее отчетливо проявляются при частичном подавлении активности фотосистемы 2. В то же время эти изменения не наблюдаются при воздействии факторов, прерывающих поток электронов между фотосистемами. Спад $I-D$ у листьев особенно четко обнаруживается при удалении кислорода (^{4, 6, 8}).

При освещении хлоропластов, в отличие от листьев, всегда наблюдалось лишь усиление Φ без сложных переходных явлений. На хлоропластах не удается обнаружить окислительное действие фотосистемы 1 на $\Delta\Phi$ даже при удалении кислорода. У пурпурных бактерий и изолированных хроматофоров также обнаружено лишь быстрое усиление Φ (⁹⁻¹¹), пропорциональное фотовыцветанию П870 в отсутствие экзогенных восстановителей в среде (⁹).

Как уже указывалось, действие фотосистемы 1 на $\Delta\Phi$ наиболее отчетливо обнаруживается при удалении кислорода, приводящем к частичному накоплению QH в «темноте» (⁶). В то же время удаление кислорода не оказывает существенного влияния на кинетику $\Delta\Phi$ хлоропластов. По-видимому, более простая кинетика $\Delta\Phi$ хлоропластов по сравнению с листьями связана с нарушением регуляции реакций восстановления и окисления Q в первую секунду освещения. Подобные нарушения могут быть объяснены не только лучшим доступом кислорода к изолированным хлоропластам, но и потерей эндогенных восстановителей и повреждением определенных структур при выделении хлоропластов. Можно предположить, что присутствие восстановителей, изменяющих состояние первичного донора и первичного акцептора фотосистемы 2 и переносчиков электрона между фотосистемами, окажет существенное влияние на кинетику $\Delta\Phi$ хлоропластов.

В связи с этим мы исследовали кинетику $\Delta\Phi$ хлоропластов в присутствии восстановителей (дитионит). Опыты проводили на хлоропластах гороха, выделенных по методу (¹²). При введении дитионита в виде щелочного раствора рН среды хлоропластов оставалась постоянной. Измерение фотоиндуцированных $\Delta\Phi$ проводили на двухлучевой установке, описанной нами ранее (¹³). Монохроматический свет слабой интенсивности (480 м μ , 5 эрг·см⁻²·сек⁻¹) возбуждал Φ объекта, выход которой изменялся под действием интенсивного освещения ($> 10^5$ эрг·см⁻²·сек⁻¹).

В опытах вначале регистрировали исходную Φ объекта $\lambda > 670$ м μ , а затем ее изменения при освещении (рис. 1, 1). Величина Φ на $\Delta\Phi$ на рисунках дана в относительных единицах.

Без дитионита, когда Φ хлоропластов мала по величине и постоянна по времени, освещение интенсивным светом 2 (600—700 м μ ; $1,5 \cdot 10^5$ эрг·см $^{-2}$ ·сек $^{-1}$) вызывает

быстрое усиление Φ (рис. 1, 1). При добавлении в темноте дитионита (0,1—0,3 мг/мл) происходит длительно медленное возрастание Φ , обусловленное, по-видимому, химическим восстановлением Q . Освещение хлоропластов интенсивным светом 2 сразу после добавления дитионита вызывает увеличение Φ , которое меньше $\Delta\Phi$ в отсутствие дитионита на величину темнового роста Φ . При освещении слабым светом 2 через несколько минут после добавления дитионита уже наблюдаются сложные переходные явления, характерные для

листьев: начальное усиление Φ , промежуточный спад и последующее усиление Φ (рис. 1, 2, 3). Выключение света вызывает падение Φ ниже исходного уровня. Подобные же эффекты мы ранее наблюдали при освещении слабым светом 2 листа в анаэробных условиях или при использовании фонового света 2 (6). Таким образом, при освещении слабым светом 2 хлоропластов в восстановительных условиях проявляется действие фотосистемы 1 (частично поглощающей свет 2), благодаря чему на хлоропластах удается наблюдать сложные $\Delta\Phi$, характерные для листьев.

При освещении светом 1 хлоропластов в присутствии дитионита наблюдается уменьшение Φ , обусловленное действием фотосистемы 1; последующее увеличение Φ на свету вызвано, очевидно, действием фотосистемы 2 (рис. 1, 4). В присутствии $5 \cdot 10^{-6}$ М диурона (рис. 1, 5) или добавлении более чем 0,02% тритона X-100 освещение светом 1 хлоропластов в восстановительных условиях вызывает уже не уменьшение, а увеличение Φ , т. е. при нарушении взаимодействия фотосистем происходит лишь восстановление Q фотосистемой 2, частично поглощающей свет 1. В восстановительных условиях освещение как светом 1, так и светом 2 фракции хлоропластов, обогащенной фотосистемой 2, вызывает только усиление Φ . Таким образом, фотоиндуцированные переходные явления Φ хлоропластов в присутствии дитионита также могут быть объяснены взаимодействием фотосистем 2 и 1 через цепь переноса электрона.

В определенных условиях освещение светом $\lambda > 670$ м μ , $1,9 \cdot 10^6$ эрг·см $^{-2}$ ·сек $^{-1}$ хлоропластов в присутствии дитионита при pH 6,7 можно наблюдать сложную кинетику $\Delta\Phi$ с такими же временными параметрами, как и при освещении листа в анаэробных условиях. Добавление диурона вызывает исчезновение промежуточного спада и резко ускоряет подъем Φ до максимального уровня. Кинетические кривые, зарегистрированные на

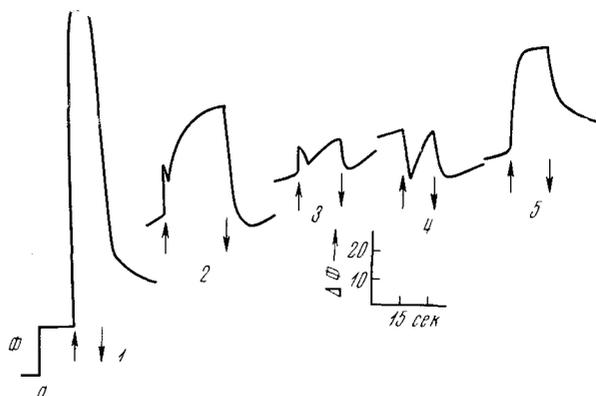


Рис. 1. Кинетика $\Delta\Phi$ при освещении хлоропластов: 1 — светом 2 в отсутствие дитионита (показан исходный уровень Φ), 2—5 в присутствии дитионита, 2 — слабый свет 2 (3% от максимальной интенсивности), 3 — слабый свет 2 (1,5%), 4 — свет 1, 5 — свет 1 в присутствии $5 \cdot 10^{-6}$ М диурона. Образец содержал 2 мл суспензии хлоропластов в 0,02 М трис-буфере (pH 7,5), содержание хлорофилла 0,01 мг/мл. a — момент включения измерительного света. Стрелками вверх и вниз обозначены соответственно включение и выключение действующего света

хлоропластах осциллографически, в точности подобны кривым, ранее измеренным на листе в анаэробных условиях. Свет 1 вызывает быстрое уменьшение Φ , которое исчезает при добавлении диурона.

Характер кинетики $\Delta\Phi$ хлоропластов существенно зависит от количества восстановителя и pH среды. В присутствии больших количеств дитионита

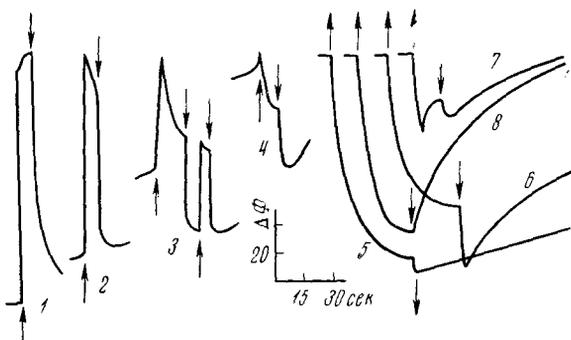


Рис. 2. Кинетика $\Delta\Phi$ хлоропластов без дитионита (1) и в присутствии 1 мг/мл дитионита (2—8). 2—4 получены при освещении светом 2 хлоропластов при pH 7,5 через разное время после добавления дитионита (т. е. при разных уровнях исходной Φ), 5—8 после достижения $\Phi_{\text{макс}}$. 5 — свет 2 (pH 7,5), 6 — свет 2 (pH 6,7), 7 — свет 1 (pH 7,5), 8 — свет 1 (pH 6,7). Характеристику образца см. в подписи к рис. 1

освещение вызывает не увеличение, а уменьшение Φ (рис. 2, 5—8). Скорость светового уменьшения Φ и обратного процесса зависят от длины волны, интенсивности, длительности освещения и от pH суспензии хлоропластов. При pH 7,5 длительное освещение интенсивным светом 2 вызывает значительное уменьшение Φ , почти необратимое в темноте (рис. 2, 5), тогда как при pH 6,7 уменьшение Φ менее выражено, но более обратимо (рис. 2, 6). Наоборот свет 1 при pH 7,5 вызывает лишь небольшое сложное по кинетике уменьшение Φ (рис. 2, 7), а при pH 6,7 наблюдается значительное уменьшение Φ (рис. 2, 8). Действие света 1 полностью обратимо.

Возникает вопрос о природе процессов, обуславливающих уменьшение Φ в сильно восстановительных условиях. Можно было бы ожидать, что когда первичные донор и акцептор и переносчики электрона полностью восстановлены, то $\Delta\Phi$ будет определяться хлорофиллом фотосистемы 1. Однако, эти $\Delta\Phi$ обусловлены фотосистемой 2, так как наблюдаются только на частицах хлоропластов, обогащенных фотосистемой 2. Уменьшение Φ , наблюдаемое при освещении хлоропластов светом 1, не наблюдается в присутствии диурона и может быть связано с окислительным действием фотосистемы 1, которое проявляется и в восстановительных условиях. Уменьшение Φ от света 2 не полностью обратимо в темноте и происходит в присутствии диурона. Очевидно, уменьшение Φ в этом случае частично может быть вызвано восстановительной фотодеструкцией активного центра фотосистемы 2.

Сложная кинетика $\Delta\Phi$ (индукция флуоресценции) наблюдается также при освещении пурпурных бактерий *Chromatium minutissimum* или изолированных хромофоров в восстановительных условиях. При добавлении дитионита происходит постепенное возрастание Φ , на фоне которого световые $\Delta\Phi$ обнаруживают сложную кинетику (рис. 3, 2—4). После темнового увеличения Φ до максимальной величины освещение вызывает уменьшение Φ , неполно обратимое в темноте (рис. 3, 5). Различная зависимость световых увеличений и уменьшений Φ от интенсивности освещения, температуры и термоинактивации указывает на то, что эти изменения обус-

та (1 мг/мл и более) наблюдается темновое увеличение Φ , а освещение хлоропластов интенсивным светом вызывает переходные явления, отличные от таковых в слабо восстановительных условиях (рис. 2). В кинетике $\Delta\Phi$, вызываемых светом 2, проявляется медленный спад (рис. 2, 2), частично необратимый в темноте (рис. 2, 3). В течение времени по мере увеличения темнового уровня Φ световой спад более выражен, а выключение света ведет к падению Φ ниже исходного уровня (рис. 2, 3, 4). При достижении максимального уровня Φ равного $\Phi + \Delta\Phi$,

ловлены различными процессами. По-видимому, у бактерий, как и у фотосистемы 2 растений, основным фактором, определяющим величину переменной флуоресценции, является окислительно-восстановительное состояние первичного акцептора электрона; фотоиндуцированное или химическое восстановление акцептора вызывает возрастание выхода флуоресценции.

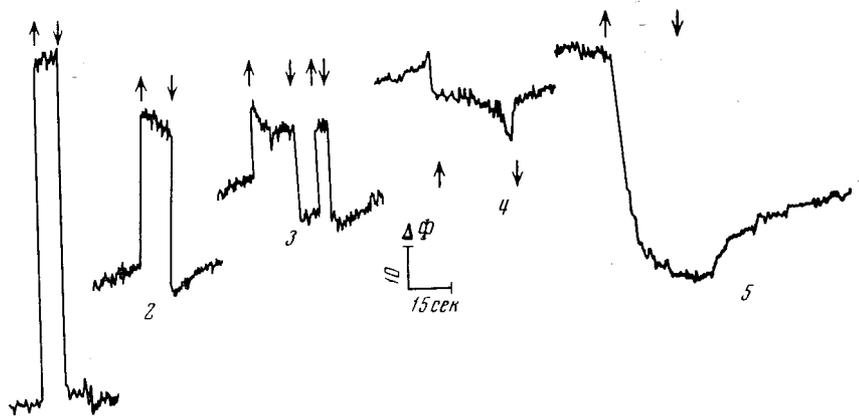


Рис. 3. Кинетика $\Delta\Phi$ при освещении суспензии пурпурных бактерий *Chromatium minutissimum* без дитионита (1) и после добавления 1 мг/мл дитионита (2—4), 5 — после достижения $\Phi_{\text{макс}}$. Возбуждающий Φ свет 790 м μ , измеряемая $\Phi \lambda > 870$ м μ . Образец содержал 2 мл суспензии бактерий в 0,05 M трис-буфере (рН 7,5) содержание бактериохлорофилла 0,03 мг/мл

Фотоиндуцированное уменьшение Φ бактерий и хромофоров в восстановительных условиях может быть также связано с фотодеструкцией активного центра.

При сравнении кинетики фотоиндуцированного уменьшения Φ хлоропластов и хромофоров следует подчеркнуть, что уменьшение Φ в восстановительных условиях наблюдается только у объектов, у которых в отсутствие восстановителя обнаруживаются значительные световые $\Delta\Phi$, что, по-видимому, связано с активностью реакционного центра фотосистемы.

Таким образом, у хлоропластов, а также у пурпурных бактерий и выделенных из них хромофоров в восстановительных условиях обнаружены сложные по кинетике $\Delta\Phi$, сходные с теми, которые наблюдаются у интактных листьев, что позволяет исследовать механизм индукции флуоресценции с использованием изолированных структур.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
6 VIII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. Kautsky, A. Hirsch, *Naturwiss.*, **19**, 964 (1931). ² Н. Kautsky, N. Appel, H. A. Mann, *Biochem. Zs.*, **332**, 277 (1960). ³ L. N. M. Duysens, H. E. Sweers, In: *Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria*, Tokio, 1963, p. 353. ⁴ J. C. Munday jr., Covindjee, *Biophys. J.*, **9**, 1 (1969). ⁵ T. T. Bannister, G. Rice, *Biochim. et biophys. acta*, **165**, 555 (1968). ⁶ Н. В. Карапетян, В. В. Климов и др., *Физиол. раст.*, **18**, 507 (1971). ⁷ P. Joliot, J. Lavorel, *Bull. Soc. chim. biol.*, **46**, 1607 (1964). ⁸ Н. Kautsky, U. Frank, *Biochem. Zs.*, **315**, 176 (1943). ⁹ W. J. Vredenberg, L. N. M. Duysens, *Nature*, **127**, 355 (1963). ¹⁰ Н. В. Карапетян, А. А. Красновский, В сборн. *Биохимия автотрофных микроорганизмов*, Тр. МОИП, **24**, 1966, стр. 94. ¹¹ R. K. Clayton, *Photochem. Photobiol.*, **5**, 807 (1966). ¹² F. R. Whately, D. I. Arnon, In: *Methods in Enzymology*, **6**, 1963, p. 308. ¹³ Н. В. Карапетян, В. В. Климов, *Физиол. раст.*, **18**, 223 (1971).