

А. Ю. БОРИСОВ, Р. А. ПЕТКОВА, М. Д. ИЛЬИНА

**СВЯЗЬ ФОТОИНДУЦИРОВАННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ
ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА
СУСПЕНЗИИ ХЛОРОПЛАСТОВ С АКТИВНОСТЬЮ ВТОРОЙ
ФОТОСИСТЕМЫ**

(Представлено академиком А. С. Спириным 20 XII 1975)

Известно, что при освещении промытых хлоропластных суспензий без экзогенных окислителей возникает сдвиг окислительно-восстановительного потенциала (о.в.п.) среды в отрицательную сторону (¹⁻³). Исследования фотоиндуцированных изменений о.в.п. среды с помощью специфических ингибиторов второй фотосистемы (ф.с. 2) — диурана, атразина, повышенной температуры — показали зависимости изменений о.в.п. от состояния электронного транспорта в ф.с. 2 (⁴⁻⁶). Было предположено, что способность хлоропластов к сдвигу о.в.п. среды в отрицательную сторону связана с накоплением восстановленных эквивалентов в результате функционирования реакционного центра ф.с. 2. С целью проверки предположения, что лишь ф.с. 2 ответственна за вышеупомянутые изменения о.в.п., в настоящей работе у суспензии хлоропластов одновременно регистрировались изменения о.в.п. среды и флуоресценции хлорофилла а, вызываемые светом разного спектрального состава. Было показано, что изменения о.в.п. среды под действием света у хлоропластов сенсibiliзируются только хлорофиллом ф.с. 2.

Выращивание гороха, выделение и промывание хлоропластов проводили как в работе (⁸). Средой выделения служили растворы 0,4 М сахарозы и 0,05 М KH_2PO_4 (рН 7,0). Концентрация хлорофилла а в исследуемой пробе объемом 1 мл составляла $7 \cdot 10^{-6}$ М.

Известно, что метод спектров действия требует весьма прецизионных измерений и последующих расчетов. Нами была разработана его модификация — сравнительный метод спектров действия, который позволил получить необходимые экспериментальные данные более простыми средствами и с большей точностью. Идея сравнительного метода состоит в следующем.

Известно, что в свечении хлоропластов растений при комнатной температуре доминирует флуоресценция от хлорофилла ф.с. 2. Так, в ряде работ (см., например, (⁷)) убедительно доказано, что спектр действия этой флуоресценции совпадает со спектром поглощения ф.с. 2. Поэтому если при измерении спектра действия изменений о.в.п. хлоропластной суспензии добиваться равенства интенсивностей флуоресценции при каждой длине волны действующего света, то это означает, что хлорофилл ф.с. 2 каждый раз получает одно и то же количество квантов света. Если допустить, что сдвиг о.в.п. среды есть результат активности ф.с. 2, то, очевидно, амплитуда изменения о.в.п. в этих условиях должна быть всегда одной и той же.

Однако, если сдвиг о.в.п. среды вызывается первой фотосистемой (ф.с. 1), то при длинах волн 665—675 нм его амплитуда должна быть в 2 раза меньше, а при 680—695 нм — в 3—5 раз больше, чем в максимуме поглощения хлоропластов при 678 нм (рис. 1). Таким образом, предложен-

ный метод весьма чувствителен, несмотря на незначительное смещение пиков абсорбции у ф.с. 1 и ф.с. 2.

Для измерения спектра действия изменений о.в.п. был сконструирован прибор, принципиальная схема которого представлена на рис. 2. Длина волны действующего света от источника 1 (100-ваттная лампа накаливания со светящимся телом диаметром 3 мм) выделялась с помощью узкополосных ($\Delta\lambda \approx 8-10$ нм) интерференционных фильтров 4, нормированные спектры пропускания которых показаны на рис. 1. Наклоняя их плоскость к оптической оси до 15° , можно изменять положение максимума пропускания света до 12 нм, существенно не ухудшая при этом спектра пропускания. Часть флуоресцентного свечения хлоропластов (рис. 1) вырезалась комбинацией светофильтров 5 и 6 (рис. 2), состоящей из интерференционного фильтра ($\lambda_{\max} = 774$ нм, $\Delta\lambda = 12$ нм, спектр пропускания на рис. 1) и скрещенных с действующим светом стеклянных фильтров СЗС-20 и КС-48. Этот свет попадал на катод мультищелочного фотоумножителя 8 (ФЭУ-38), питаемого от сетевого источника напряжения 9 с коэффициентом стабилизации 300, и регистрировался на шкале микроамперметра 10. Контрольные опыты показали, что доля действующего света, попадавшего на фотоумножитель, не превышала 5—7%. Анодный ток фотоумножителя, пропорциональный интенсивности флуоресценции хлорофилла а в образце, в каждом опыте после изменения длины волны действующего света приравнивали к одной и той же величине путем небольшой регулировки напряжения на лампе 1 и смены нейтральных светофильтров 3. После включения света образец выдерживали 15—20 мин. в темноте до достижения стационарного уровня темнового о.в.п. среды, а затем повторно освещали светом той же интенсивности и того же спектрального состава и проводили регистрацию фотоиндуцированного изменения о.в.п. с помощью платинового и каломельного электродов 11. Сигнал от электродов усиливался электронным милливольтметром от рН-метра рН 340 и с него поступал на самописец ЭППИ-09 М2.

Спектр поглощения хлоропластов и спектры пропускания интерференционных фильтров регистрировали на спектрофотометре СФ-10, спектр флуоресценции хлоропластов — на спектрофлуориметре «Aminco — Bowman». Эксперименты проводили при комнатной температуре.

При включении света у суспензии хлоропластов наблюдалось медленное смещение о.в.п. среды на несколько милливольт в отрицательную сторону. Стационарный уровень о.в.п. достигался через 1,5—2 мин. После выключения света система наполовину релаксировала в исходное состояние в течение 45—50 сек. С целью уменьшения погрешности, вносимой дрейфом темнового уровня о.в.п. среды, измерения фотоиндуцированных изменений о.в.п. проводили не в стационарных условиях, а в первые 45 сек. освещения (см. рис. 3).

Перед измерением спектра действия фотоиндуцированных изменений о.в.п. было проверено, что интенсивность возбуждающего света не вызывала насыщения эффекта. На рис. 3 показано, как меняется интенсивность флуоресценции (2) и скорость изменения о.в.п. среды (3) от интенсивности падающего света с длиной волны 672 нм. Кривые 2 и 3 линейны вплоть до интенсивности света, составляющей 70% от максимально достижимой. При других длинах волн действующего света (больших и меньших 672 нм) линейность кривой 3 сохранялась при больших интенсивностях падающего света, что свидетельствует о преобладающей роли хлорофилла а ф.с. 2 в фотоизменениях о.в.п. среды. Для измерения спектра действия на основании изучения зависимостей типа 2 и 3 рис. 3 были выбраны области рабочих интенсивностей на всех длинах волн действующего света.

На рис. 4 приведены результаты измерений фотоиндуцированных изменений о.в.п. среды при одинаковом уровне возбуждаемой флуоресценции в функции длины волны действующего света. В диапазоне 665—695 нм каждая точка на рис. 4 — усредненный результат 7 измерений (при

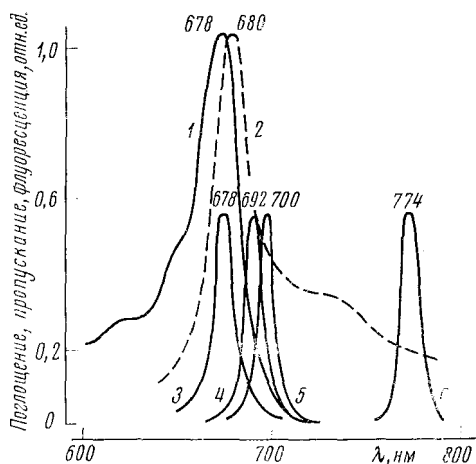


Рис. 1

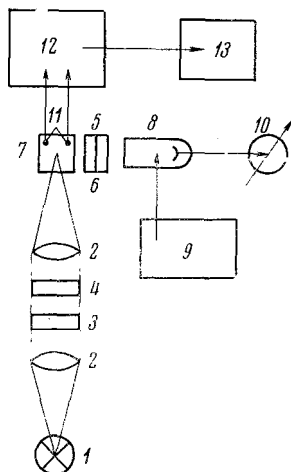


Рис. 2

Рис. 1. Нормированные спектры поглощения (1) и флуоресценции (2) хлоропластов и спектры пропускания интерференционных фильтров (3-6) (указаны длины волн в максимумах)

Рис. 2. Блок-схема прибора для измерения фотоиндуцированного изменения о.в.п. среды и флуоресценции. 1 — источник света, 2 — линза, 3 — нейтральный светофильтр, 4 — интерференционный светофильтр с регулируемым наклоном плоскости к оптической оси, 5 — светофильтр, 6 — интерференционный светофильтр, 7 — кювета с мешалкой, 8 — фотоумножитель, 9 — стабилизированное питание фотоумножителя, 10 — микроамперметр, 11 — электроды, 12 — милливольтметр, 13 — самописец

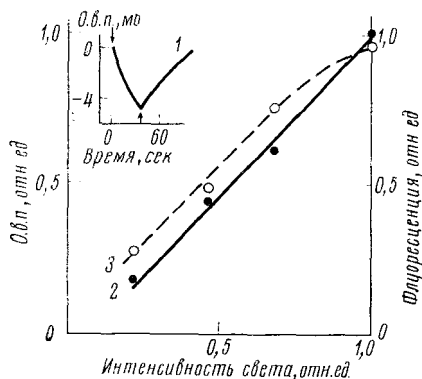


Рис. 3

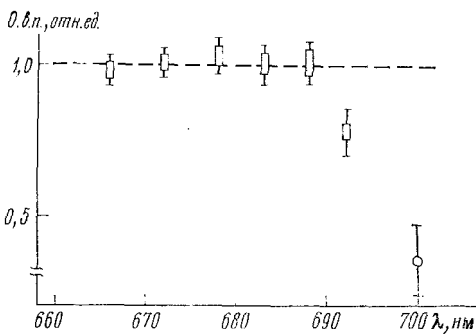


Рис. 4

Рис. 3. Кинетика изменения о.в.п. суспензии хлоропластов (1) под действием света (стрелка, направленная вниз, — включение, вверх — выключение действующего света). Зависимость флуоресценции (2) и фотоиндуцированного изменения о.в.п. (3) суспензии хлоропластов от интенсивности действующего света. Длина волны действующего света 672 нм

Рис. 4. Зависимость фотоиндуцированного изменения о.в.п. суспензии хлоропластов от длины волны действующего света при постоянном уровне флуоресценции

700 нм — 4 измерений); для них вычислены средняя арифметическая и средняя квадратичная (прямоугольник) ошибки.

Практически постоянное значение изменения о.в.п. среды, вызываемого светом, который поглощался как с коротковолновой, так и с длинноволновой сторон красного пика поглощения хлоропластов (λ 666, 672, 678, 683, 688 нм), неопровержимо доказывает, что одна и та же фракция хлорофилла ответственна за измеряемую флуоресценцию и фотоиндуцированный сдвиг о.в.п. среды в отрицательную сторону. По общепринятым представ-

лениям, во флуоресценции хлоропластов при комнатной температуре преобладает свечение хлорофилла а ф.с. 2. Следовательно, за генерацию изменений о.в.п. в основном ответствен хлорофилл а ф.с. 2.

Значительное падение скорости (амплитуды) изменения о.в.п. при сохранении уровня возбуждаемой флуоресценции под действием света с $\lambda > 690$ нм свидетельствует о падении поглощения ф.с. 2 до столь низкого уровня, что появляются свечения форм хлорофилла, нефотоактивных в сдвиге о.в.п. среды. Это могут быть как молекулы пигмента, принадлежащего ф.с. 1, так и агрегаты пигмента, не связанные с фотосинтезом.

Из падения амплитуды изменения о.в.п., а следовательно, и флуоресценции хлорофилла ф.с. 2, при 692 нм на 22% (рис. 4) можно оценить соотношение поглощения ф.с. 1 и ф.с. 2, полагая, что свечение неактивных в фотосинтезе форм пигмента при этой длине волны еще мало. Исходя из полученного выше соотношения интенсивностей флуоресценции ф.с. 1 и ф.с. 2 (22:78) и значений выходов флуоресценции ф.с. 1 (0,2%) и ф.с. 2 (10%), оцененных в работах (⁹, ¹⁰), следует, что соотношение поглощения ф.с. 1 и ф.с. 2 при 692 нм составляет $22 \cdot 10 / (78 \cdot 0,2) = 14$. Отметим, что цифры, взятые для расчетов, характеризуют объект в разных фотохимических состояниях: так, значения выходов флуоресценции — в условиях светового насыщения, интенсивности флуоресценции ф.с. 2 — в условиях линейного фотосинтеза. Полагая, что ф.с. 1 в условиях опыта также не насыщена по свету и при переходе к насыщению интенсивности флуоресценции обеих фотосистем увеличатся одинаково, можно считать полученную оценку правильной.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
13 XI 1975

Институт физиологии растений
Болгарской Академии наук
София

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ F. C. Gerretsen, *Plant and Soil*, v. 2, 159 (1950). ² H. S. A. Gilmour, R. Lumry, J. D. Spikes, *Plant Physiol.*, v. 28, 89 (1953). ³ В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова, Н. А. Рыбалко, *Биохимия*, т. 23, 825 (1958). ⁴ R. A. Petkova, *C. R. Acad. bulg. Sci.*, v. 24, 103 (1971). ⁵ R. A. Petkova, Yu. Zeinalov, S. Dilova, *Photosynthetica*, v. 7, 226 (1973). ⁶ R. A. Petkova, *C. R. Acad. bulg. Sci.*, v. 27, 1707 (1974). ⁷ L. N. M. Duysens, H. E. Sweers, In: *Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria*, Tokyo, 1963, p. 353. ⁸ А. Ю. Борисов, М. Д. Ильина, *Молек. биол.*, т. 3, 391 (1969). ⁹ А. Ю. Борисов, М. Д. Ильина, *Биохимия*, т. 36, 822 (1971). ¹⁰ A. Yu. Borisov, M. D. Il'ina, *Biochim. et biophys. acta*, v. 305, 364 (1973).