

57
A-51



Биолого-почвенный факультет

На правах рукописи

К.Н. ТИМОФЕЕВ

ИЗУЧЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ ПРОЦЕССОВ ФОТОСИНТЕЗА
МЕТОДОМ ЭПР

(диссертация написана на русском языке)

(биофизика, 0-91)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

ИЗДАТЕЛЬСТВО МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА • 1972

СК
57
A51

Работа выполнена в проблемной лаборатории космической биологии
Биолого-почвенного факультета МГУ

Научный руководитель — доктор биологических наук
профессор А.Б.РУБИН

Официальные оппоненты — доктор физико-математических наук
профессор Л.П.КАКШИН
кандидат биологических наук
Ф.Ф.ЛИТВИН

Ведущее учреждение — ордена Ленина Институт биохимии
им.А.Н.Баха АН СССР

Автореферат разослан "_____" _____ 1972 г.

Защита диссертации состоится "_____" _____ 197__ г.
на заседании Ученого совета Биолого-почвенного факультета МГУ,
в аудитории Малая I, зона А.

Просьба Ваши отзывы и замечания присылать по адресу:
Москва, П17234, Ленинские горы, МГУ, Биолого-почвенный факультет,
Ученый совет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биолого-почвенного
факультета МГУ.

В настоящее время широко известно, что освещение фотосинтезирующих организмов приводит к появлению в них фотоиндуцированных сигналов электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). С момента открытия этого явления (Commoner *et al.*, 1954) основные усилия были сосредоточены на выяснении природы парамагнитных центров, ответственных за появление сигналов. Работами ряда исследователей (Beinart *et al.*, 1962; Weaver, Bishop, 1963; Zochaco, 1963; Bolton *et al.*, 1969 и др.) было показано, что фотоиндуцированные сигналы ЭПР зеленых растений (сигнал I) и пурпурных фотосинтезирующих бактерий обусловлены световыми превращениями фотоактивных пигментов P₇₀₀ и P₈₇₀₋₈₉₀.

Большинство результатов, на которых основан этот вывод, получено при изучении хлоропластов высших растений и хромофоров фотосинтезирующих бактерий. Вместе с тем, связь фотоиндуцированного парамагнетизма с процессом фотосинтеза в клетках интактных организмов исследована в меньшей степени. Однако решение этого вопроса представляется интересным как для более детального выяснения фотореакций пигментов в неповрежденных фотосинтезирующих объектах, так и для определения возможностей применения метода ЭПР к изучению фотосинтеза.

Одним из подходов к решению этой проблемы является исследование фотоиндуцированных сигналов ЭПР при различных воздействиях, приводящих к изменению скоростей транспорта электронов. В литературе имеются данные об изменении величины сигнала I зеленых растений при блокировании транспорта электронов диуроном (Weaver, Weaver, 1963; Kok, Beinart, 1962, и др.), однако сведения о действии других ингибиторов отсутствуют, хотя они интересны для уточнения характера связи этого сигнала с электротранспортными реакциями фотосинтеза.

Фотосинтезирующие бактерии в данном плане практически не изу-

чались. В специальном исследовании Шейера (Shleyer, 1968) коррелиция сигнала ЭПР с протекающим на свету транспортом электронов не была установлена.

Наряду с изучением транспорта электронов по цепи переносчиков, важной и малоисследованной проблемой фотосинтеза остается природа первичных процессов разделения заряда в реакционных центрах фотосинтетических единиц. В этой связи представляет интерес изучение фотоиндуцированного парамагнетизма при отрицательных температурах, когда заторможены ферментативные процессы.

Основные задачи данной работы заключались в следующем:

1. Исследование связи фотоиндуцированных сигналов ЭПР зеленых растений и фотосинтезирующих бактерий с процессами транспорта электронов с помощью ингибиторов фотосинтеза и других воздействий, влияющих на электротранспортные реакции.

2. Изучение фотоиндуцированных сигналов ЭПР фотосинтезирующих организмов в условиях низких температур с целью выяснения природы первичных реакций, приводящих к появлению этих сигналов.

3. Модификация серийного радиоспектрометра РЗ-1301 с целью повышения чувствительности и стабильности работы установки и разработка методов проведения измерений на интактных фотосинтезирующих организмах как при комнатной, так и при низкой температурах.

Техника проведения экспериментов

Проведение экспериментов с нативными биологическими объектами требует применения приборов, обладающих высокой чувствительностью и стабильностью в работе. В связи с этим нами была проведена модернизация серийного радиоспектрометра РЗ-1301, что позволяло исследовать неповрежденные фотосинтезирующие организмы.

Основным изменениям при переделке радиоспектрометра подверглась схема усиления сигнала ЭПР, автоматической подстройки частоты квантронна (АПЧ) и высокочастотной модуляции магнитного поля.

СВЧ-тракт собран по отражательной схеме. Источником СВЧ-колебаний служит квантрон К-54, питание которого осуществляется от отдельного источника стабилизированных напряжений.

Чувствительность спектрометра позволяет зарегистрировать сигнал ЭПР ионов марганца в водном растворе $MnCl_2$ при концентрации соли $5 \cdot 10^{-6} M$ с соотношением амплитуд сигнала и шума, равным 8:1, при постоянной времени прибора 0,5 сек.

Суспензии интактных клеток водорослей или фотосинтезирующих бактерий помещались в плоскую кварцевую кювету малого объема с внутренним зазором 0,2 мм, высотой 45 мм и шириной 7 мм.

При исследовании фотоиндуцированных сигналов ЭПР высших растений вырезавшаяся из листа пластинка вставлялась в кварцевый капилляр.

Освещение образца в резонаторе радиоспектрометра проводили лампой ДКСЛ-1000 через водный проточный тепловой фильтр и стеклянные светофильтры или через монохроматор.

Для регистрации фотоиндуцированных сигналов ЭПР при отрицательных температурах образцы, помещенные в специально сконструированную плоскую кварцевую кювету объемом 0,008 мл, обдувались струей охлажденного азота.

Температура образца контролировалась с помощью термометра.

Объектами исследования служили водоросли *Anacystis nidulans*, фотосинтезирующие бактерии *Rhodospirillum rubrum* и листья традесканции и аспидистры. В некоторых опытах использовались также фотосинтезирующие бактерии *Eclothiodospira shapashnikovii* и хроматофоры бактерий *Rhodospirillum rubrum*.

I. Исследование связи фотоиндуцированных сигналов ЭПР с электротранспортными реакциями фотосинтеза зеленых растений

При освещении красным светом листьев высших растений и водорослей наблюдается фотоиндуцированный сигнал ЭПР I с шириной между точками максимального наклона $\Delta H = 7-8\text{e}$ и с g -фактором, близким к g -фактору свободного электрона.

Для выяснения связи процессов, ведущих к появлению этого сигнала ЭПР с фотореакциями фотосинтеза, исследовался спектр действия фотоиндуцированного сигнала ЭПР в листьях традесканции и водорослей.

В спектрах действия наблюдается максимум в длинноволновой области спектра 680-790 нм, что соответствует максимуму в спектрах поглощения этих растений. С уменьшением длины волны возбуждающего света величина фотоиндуцированного сигнала ЭПР сильно уменьшается (рис.1).

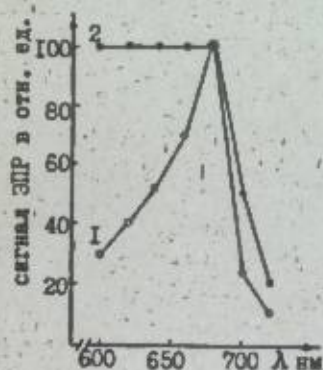


Рис.1
Спектр действия фотоиндуцированного сигнала ЭПР нормальных (1) и обработанных диуроном (2) водорослей *Anacystis nidulans*.

Однако спектр действия фотоиндуцированного сигнала ЭПР не совпадает со спектром поглощения этих объектов в коротковолновой красной области, где у листьев наблюдается значительное поглощение, а у водорослей *Anacystis nidulans* имеется также максимум поглощения при 628 нм.

Наблюдаемое резкое уменьшение сигнала ЭПР зеленых растений при освещении объекта коротковолновым красным светом может быть обусловлено дополнительным восстановлением окисленной молекулы P_{700} за счет нециклического потока электронов от фотосистемы II.

Для проверки этого предположения нами проводились опыты по действию ингибиторов фотосинтеза, блокирующих реакции переноса электронов, таких, как диурон, гидросиламин, салицилальдоксим, тинакрил.

В листьях традесканции и водорослей *Anacystis nidulans* в присутствии диурона, тормозящего нециклический транспорт электронов между двумя фотосистемами, наблюдалось увеличение сигнала, индуцированного коротковолновым красным светом, в то время, как величина сигнала, индуцированного светом $\lambda = 680$ нм, не изменялась (рис.1).

Наблюдаемое изменение величин сигнала ЭПР зеленых растений может быть связано, очевидно, с изменением степени окисленности P_{700} в этих условиях, поскольку при действии диурона восстановление окисленного P_{700} за счет нециклического транспорта электронов прекращается, что приводит к общему увеличению сигнала ЭПР, индуцируемого коротковолновым красным светом.

Наоборот, степень окисленности P_{700} при освещении дальним красным светом определяется скоростями циклического переноса электрона, не чувствительного к действию диурона, так что величина сигнала ЭПР, индуцируемого дальним красным светом, не изменяется в присутствии диурона.

В наших опытах гидроксиламины в концентрации $10^{-3}M - 10^{-2}M$ и хиноклин в концентрации $5 \cdot 10^{-4}M$ приводили к тем же изменениям величины фотондуцированного сигнала ЭП водорослей *Anacystis nidulans*, что и джурон. Наблюдаемые эффекты связаны, очевидно, с тем, что гидроксиламины ингибируют нециклический транспорт электронов на участке от воды до фотосистемы II (Elstner a.o., 1969), а хиноклин на уровне флавиновых ферментов (Naas, 1944), возможно принимающих участие в реакции восстановления НАДФ.

В присутствии салицилальдоксима наблюдается заметное замедление скорости нарастания сигнала после включения света и уменьшение величины сигнала, индуцированного как ближним, так и дальним красным светом.

Очевидно, влияние салицилальдоксима вызвано не только способностью этого вещества ингибировать нециклический транспорт электронов на уровне пластоцианина (Kouchkovsky, Tokh, 1964; Tokh, Urbach, 1964), но и действием этого вещества на перенос электронов от P_{700} к молекулам акцепторов.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов говорят о том, что фотондуцированный сигнал ЭП зеленых растений сравнительно мал, когда перенос электронов по нециклическому пути происходит достаточно эффективно (освещение объекта коротковолновым красным светом) и возрастает при подавлении нециклического потока электронов (в присутствии ингибиторов или при освещении объекта длинноволновым красным светом).

Для более детального выяснения характера связи фотондуцированного сигнала ЭП зеленых растений с реакциями фотосинтеза исследовалась кинетика этого сигнала в водорослях *Anacystis nidulans*. Кинетика нарастания фотондуцированного сигнала ЭП этих водорослей имеет сложный характер и зависит от времени выдерживания объекта в темноте. В случае длительной темновой адаптации

кинетика нарастания состоит из двух фаз — быстрой, следующей за включением света, с последующим, более медленным нарастанием сигнала до стационарного значения. При короткой темновой адаптации образца сигнал возрастает до стационарного значения в течение нескольких секунд и медленная фаза в кинетике нарастания сигнала практически отсутствует.

Зависимость скорости нарастания фотондуцированного сигнала ЭП от времени темновой инкубации объекта показывает, что кинетика накопления окисленных форм фотоактивного пигмента P_{700} во многом зависит от темновых процессов. Это предположение подтверждают результаты экспериментов, в которых было показано, что кинетика нарастания сигнала не зависит от длительности предварительного освещения объекта светом высокой интенсивности и не изменяется при добавлении к водорослям джурона. Механизм влияния темновых процессов на окисление P_{700} , по-видимому, довольно сложен. Можно предположить, однако, что стационарная концентрация окисленных пигментов и кинетика их накопления зависят, в том числе, и от содержания в клетках эндогенных восстановителей. В наших опытах, как и в опытах других авторов (Beineti a.o., 1962; Heise, Vetterl, 1963, и др.), фотондуцированный сигнал ЭП водорослей уменьшался в присутствии восстановителей.

Кроме того, при использовании в качестве восстановителя аскорбата Na наблюдался фотондуцированный сигнал ЭП полуокисленной формы этого соединения, причем скорости нарастания сигнала I и окисления аскорбата совпадали.

II. Изучение связи фотондуцированных сигналов ЭП пурпурных фотосинтезирующих бактерий с процессом электронного транспорта

Представлялось интересным изучить связь между фотондуцированным сигналом ЭП и электронтранспортными реакциями на фото-

синтезирующих бактерий, имеющих, как известно, одну фотохимическую систему.

С этой целью исследовались фотоиндуцированные сигналы ЭПР бактерий в присутствии ингибиторов фотосинтеза и при различном содержании экзогенного донора электронов в среде.

В качестве ингибиторов бактериального фотосинтеза нами использовались хинокрин, салицилальдоксим и о-фенантролин. О-фенантролин, блокирующий перенос электронов между первичным и вторичным акцепторами (Patzon, 1970), в концентрациях 10^{-4} М - 10^{-3} М вызывал заметное уменьшение величины фотоиндуцированного сигнала ЭПР бактерий *Rhodospirillum rubrum*, причем в присутствии этого вещества наблюдалось уменьшение сигнала во время освещения.

При добавлении салицилальдоксима в концентрации 5×10^{-2} М величина сигнала сразу после включения света превышала таковую в неостраивенных ингибитором бактериях *Rh. rubrum*, после чего сигнал сильно уменьшался непосредственно во время освещения.

Салицилальдоксим, являясь ингибитором оксиданной активности, влияет на степень фотоокисленности цитохромов в аэробных условиях (Коваленко, 1969).

Вместе с тем, сходство действия салицилальдоксима и о-фенантролина указывает на ингибирование салицилальдоксимом и реакцией переноса электронов на уровне акцепторов.

Хинокрин в наших опытах не приводил к изменению величины фотоиндуцированного сигнала ЭПР бактерий *Rhodospirillum rubrum*.

Полученные результаты, так же как и в случае зеленых растений, указывают на взаимосвязь величины фотоиндуцированного сигнала ЭПР фотосинтезирующих бактерий, отражающую степень окисленности $P_{870-890}$ с эффективностью протекания электронтранспортных реакций.

Очевидно, что в таком случае величина сигнала ЭПР должна

определяться соотношением скоростей потоков электронов на входе и выходе электронтранспортной цепи.

Для проверки этого предположения исследовалось влияние концентрации экзогенного донора электронов на величину фотоиндуцированного сигнала ЭПР фотосинтезирующих бактерий.

В опытах использовались пурпурные серобактерии *Chlorothrix obliqua* и NO_2^- - в качестве донора электронов.

Ранее проведенные в нашей лаборатории исследования показали, что интенсивность послесвечения этих бактерий возрастает при увеличении концентрации экзогенного донора, что связано с ускорением нециклического потока электронов. Поэтому параллельно с регистрацией фотоиндуцированного сигнала ЭПР нами проводились измерения послесвечения.

Эксперименты показали, что величина фотоиндуцированного сигнала ЭПР бактерий *Chlorothrix obliqua* уменьшается по мере увеличения концентрации донора в среде. В этих же условиях наблюдается увеличение послесвечения клеток.

Сопоставление этих фактов свидетельствует о том, что уменьшение величины фотоиндуцированного сигнала ЭПР с изменением концентрации экзогенного донора в среде действительно связано с реакцией восстановления окисленной молекулы фотоактивного пигмента за счет нециклического транспорта электронов.

Стационарная концентрация $P_{870-890}$ в окисленном состоянии зависит и от соотношения скоростей прямой и обратной реакции взаимодействия фотоактивного пигмента с акцепторами электрона.

Нами было установлено, что о-фенантролин вызывал уменьшение сигнала ЭПР хроматофоров бактерий *Rhodospirillum rubrum* только при наличии в среде донора электронов. Очевидно, в присутствии донора ингибирование переноса электронов между акцепторами приводит к образованию избытка фотовосстановленного первичного

акцептора, и, как следствие, и ускорению обратной реакции этого продукта с окисленным пигментом, что и вызывает уменьшение фотоиндуцированного сигнала ЭПР.

Таким образом, полученные результаты показывают, что величина фотоиндуцированного сигнала ЭПР пурпурных фотосинтезирующих бактерий зависит от соотношения скоростей реакций переноса электрона, ведущих к окислению и восстановлению фотоактивного пигмента $P_{870-890}$.

В наших экспериментах исследовалась также кинетика фотоиндуцированного сигнала ЭПР бактерий *Rhodospirillum rubrum*. Так же как и в водорослях *Anacystis nidulans*, кинетика нарастания сигнала ЭПР этих бактерий имела сложный характер и зависела от времени выдерживания бактериальной суспензии в темноте. С уменьшением времени темновой адаптации объекта время достижения стационарного значения сигнала уменьшалось. Длительность предварительного освещения объекта светом высокой интенсивности не влияла на кинетику нарастания фотоиндуцированного сигнала ЭПР бактерий *Rhodospirillum rubrum*.

Эти факты говорят о влиянии темновых процессов, на фотореакции $P_{870-890}$. Можно предположить, что кинетика накопления и стационарная концентрация окисленных форм пигмента $P_{870-890}$ зависят и от содержания эндогенных восстановителей, накапливающихся в клетках бактерий в темноте.

В пользу этого свидетельствует тот факт, что фотоиндуцированный сигнал ЭПР бактерий *Rhodospirillum rubrum* в наших опытах уменьшался в присутствии восстановителей.

Кроме того, кинетика нарастания фотоиндуцированного сигнала ЭПР изменялась при аэрации бактериальной суспензии: нарастание сигнала после включения света происходило быстро, и медленная фаза в кинетике нарастания сигнала отсутствовала. Такое действие

аэрации можно объяснить окислением при действии кислорода находящихся в клетке восстановителей.

III. Исследование фотоиндуцированных сигналов ЭПР пурпурных фотосинтезирующих бактерий при низких температурах

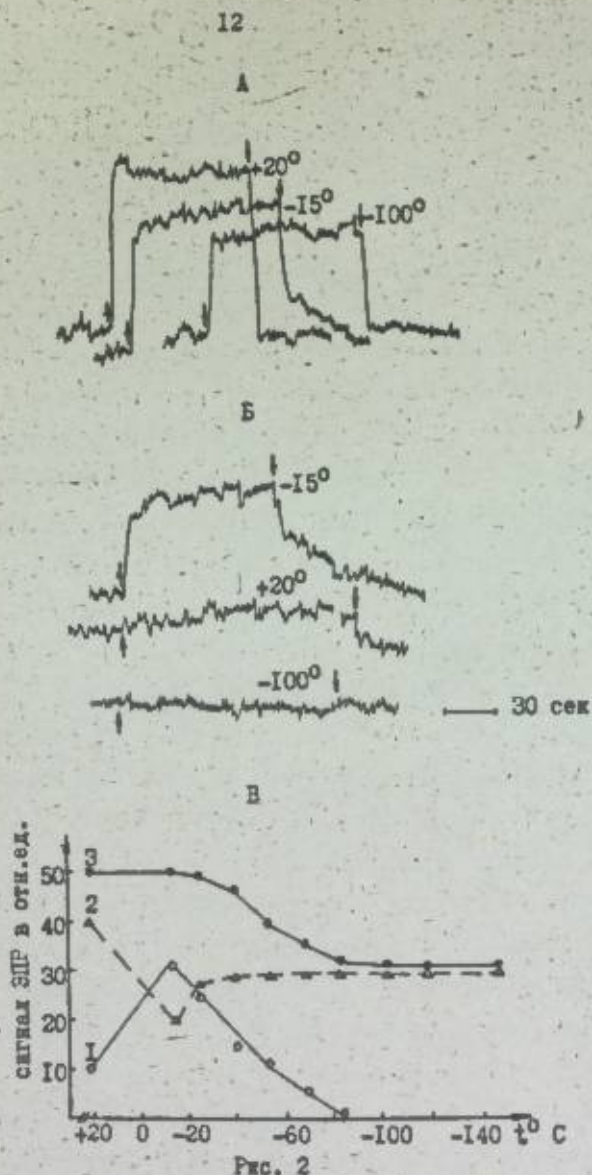
Реакции, соотношение скоростей которых определяет в совокупности стационарную концентрацию окисленных фотоактивных пигментов и, тем самым, величину фотоиндуцированного сигнала ЭПР, могут различаться, в свою очередь, по температурной зависимости и, в таком случае, их можно исследовать отдельно. Для выяснения этого в настоящей работе изучались фотоиндуцированные сигналы ЭПР пурпурных фотосинтезирующих бактерий и зеленых растений при различных температурах в диапазоне от $+20^{\circ}\text{C}$ до -150°C .

Необходимо отметить, что в интервале температур от $+20^{\circ}\text{C}$ до -15°C мы регистрировали сигнал только при температурах $+20^{\circ}\text{C}$ и -10°C - -15°C .

Понижение температуры, как показали наши эксперименты, приводит к заметному изменению кинетики гибели фотоиндуцированного сигнала ЭПР бактерий *Rhodospirillum rubrum*.

При комнатной температуре сигнал быстро затухает после выключения света, а при понижении температуры до -15°C в кинетике затухания сигнала наблюдается быстрая и медленная фазы, сильно различающиеся по скоростям. Быстрая реакция гибели сигнала протекает за доли секунды, в то время, как медленная реакция - за несколько десятков секунд (рис.2).

Исследование зависимости величины медленно затухающего и быстрозатухающего сигналов от интенсивности возбуждающего света показало, что медленнозатухающий сигнал наблюдается при низких интенсивностях возбуждающего света, тогда как быстрозатухающий - только при высоких.



Кинетика сигналов ЗПР бактерий *Rh. rubrum*, индуцированных светом высокой /А/ и низкой /Б/ интенсивности, при различных температурах; температурная зависимость /В/ величин медленнозатухающего /1/, быстрозатухающего /2/ и суммарного /3/ обратимых фотоиндуцированных сигналов.

Изучение кинетики гибели фотоиндуцированного сигнала ЗПР бактерий *Rhodospirillum rubrum* при различных температурах обнаружило и различную температурную зависимость величин этих сигналов.

Медленнозатухающий сигнал, при понижении температуры от комнатной до -15°C , заметно увеличивается, а с дальнейшим понижением температуры уменьшается и при температурах ниже -100°C отсутствует (рис. 2Б, В). Быстрозатухающий сигнал, наоборот, с понижением температуры до -15°C уменьшается, при дальнейшем понижении температуры возрастает и наблюдается при температурах ниже -100°C (рис. 2А, В).

Величина суммарного сигнала (быстрозатухающий + медленнозатухающий) не изменяется в температурных пределах от $+20^{\circ}\text{C}$ до -20°C и затем несколько уменьшается при понижении температуры до -150°C (рис. 2В).

Наличие двух фотоиндуцированных сигналов ЗПР фотосинтезирующих бактерий, отличающихся по кинетическим характеристикам, световой и температурной зависимостям, отражает, очевидно, существование нескольких реакций восстановления окисленного пигмента $P_{870-890}$.

В пользу этого говорит и наблюдавшееся в наших экспериментах различие в световых кривых суммарного сигнала, в зависимости от температуры.

Понижение температуры приводит, очевидно, к прекращению нециклического транспорта электронов. В силу этого восстановление окисленной молекулы $P_{870-890}$ в условиях низких температур происходит за счет обратного переноса электронов от восстановленных на свету акцепторов к окисленному пигменту.

Полученные результаты хорошо объясняются, исходя из предположения о существовании нескольких акцепторов электронов, последо-

важно расположенных в электронтранспортной цепи после $P_{870-890}$ (Ratson, 1969).

С этой точки зрения быстрая реакция гибели сигнала обусловлена обратным переносом электрона от фотовосстановленного первичного акцептора к окисленной молекуле $P_{870-890}$, а медленная — аналогичным процессом между восстановленным вторичным акцептором и окисленным пигментом.

Дополнительное подтверждение этого предположения было получено в экспериментах, в которых исследовались фотоиндуцированные сигналы ЭПР в бактериях *Rhodospirillum rubrum*, замороженных до -196°C на свету или в темноте.

Как показали специально проведенные опыты, в фотосинтезирующих бактериях *Rhodospirillum rubrum* при отрицательных температурах образуется также относительно небольшой по величине стабильный фотоиндуцированный сигнал ЭПР, длительно сохраняющийся после выключения света. В наших экспериментах этот сигнал наблюдался при умеренно низких температурах ($t > -100^{\circ}\text{C}$) и отсутствовал при температуре жидкого азота.

Наличие стабильного фотоиндуцированного сигнала ЭПР указывает на существование акцепторов, являющихся глубокими ловушками для электрона, донируемого $P_{870-890}$ при его окислении светом.

IV. Исследование фотоиндуцированных сигналов ЭПР зеленых растений при низких температурах

В наших экспериментах наблюдалось изменение величины фотоиндуцированного сигнала ЭПР I листьев высших растений и водорослей *Anacystis nidulans*, в зависимости от температуры объекта.

Сигнал, индуцированный монохроматическим светом ($\lambda = 600$ нм или 680 нм), увеличивался в несколько раз при понижении температуры от комнатной до -40°C , а при температуре -150°C величина наблюдавшегося сигнала была равна или немного меньше величины таково-

го при комнатной температуре.

Фотоиндуцированный сигнал ЭПР, зеленых растений при отрицательных температурах, после выключения действующего света исчезал не полностью (рис. 3А).

Таким образом, в зеленых растениях при отрицательных температурах наблюдаются кинетически различные — обратимый и стабильный — фотоиндуцированные сигналы ЭПР. Изучения зависимости величины этих сигналов от интенсивности действующего света показало, что стабильный сигнал насыщается при низких интенсивностях действующего света, а обратимый — при высоких.

С целью выяснения природы реакций, приводящих к появлению обратимого и стабильного фотоиндуцированных сигналов ЭПР зеленых растений, исследовалась температурная зависимость величины этих сигналов. Величина обратимого сигнала ЭПР водорослей *Anacystis nidulans* индуцированного светом 680 нм, при понижении температуры образца от $+20^{\circ}\text{C}$ до -15°C уменьшается, при дальнейшем понижении температуры до -40°C увеличивается, достигая в этой точке максимальной величины в области отрицательных температур, а при дальнейшем замораживании до -150°C значительно уменьшается. Кривая температурной зависимости величины сигнала ЭПР, индуцированного коротковолновым красным светом ($\lambda = 600$ нм), имеет тот же характер, за исключением того, что на участке температурной кривой в области от $+20^{\circ}\text{C}$ до -40°C сигнал монотонно увеличивается (рис. 3Б).

Температурная зависимость обратимого индуцированного монохроматическим светом сигнала в листьях высших растений (асpidистре) имеет аналогичный вид в области отрицательных температур.

Стабильный фотоиндуцированный сигнал ЭПР в отличие от обратимого возрастал при понижении температуры (рис. 3В).

Кинетика исчезновения сигнала ЭПР, индуцируемого светом в

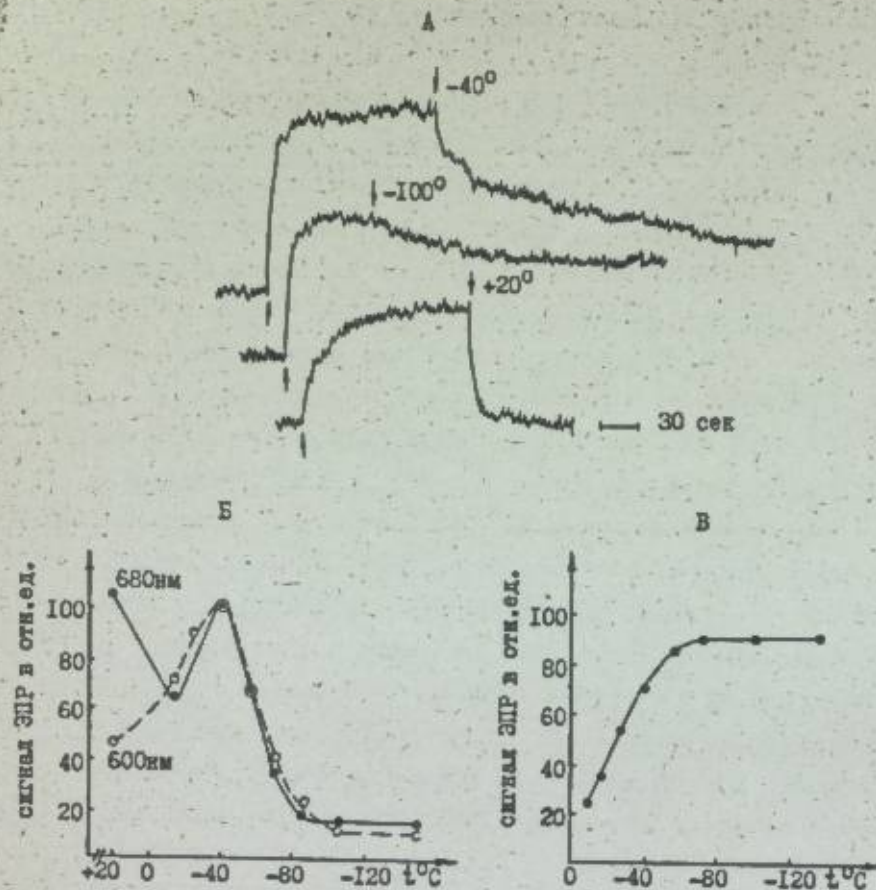


Рис. 3

Кинетика фотоиндуцированного сигнала ЗПР водорослей *Aspergillus nidulans* при различных температурах /А/; температурная зависимость величины обратимого, индуцированного светом различных длин волн, /Б/ и стабильного /В/ сигналов.

зеленых растениях при отрицательных температурах, отражает процесс восстановления в этих условиях фотоокисленного P_{700} .

Транспорт электронов между двумя фотосистемами при отрицательных температурах, очевидно, прекращается. Об этом говорит, в частности, и наблюдавшееся в наших опытах сходство спектра возбуждения обратимого сигнала со спектром возбуждения сигнала, индуцируемого светом при комнатной температуре в присутствии дурона.

Восстановление фотоокисленного P_{700} при отрицательных температурах происходит, таким образом, в результате обратного переноса электрона от восстановленных акцепторов к окисленному пигменту. Стабильный фотоиндуцированный сигнал в таком случае отражает процесс захвата молекулами акцепторов электронов, донируемых на свету фотоактивным пигментом, а обратный — обратный перенос электронов от фотовосстановленных акцепторов к окисленному на свету пигменту, причем как тот, так и другой процесс являются температурно-зависимыми.

В пользу высказанных предположений говорит и обнаруженный в наших экспериментах различный характер изменений величины стабильного фотоиндуцированного сигнала при разогревании водорослей или листьев аспидистры, замороженных до -150°C в темноте или под лучом действующего света.

Опыты проводились следующим образом:

В первом случае образец замораживался на свету до -150°C , после чего свет выключался, и образец нагревался в темноте.

В другом случае образец замораживался до -150°C в темноте, освещался при этой температуре и после выключения света разогревался.

Стабильный сигнал в образцах, замороженных на свету, заметно уменьшался при температуре ниже -100°C и полностью исчезал около -10°C .

В образцах, замороженных в темноте, наблюдался меньший по величине стабильный сигнал, который исчезал при повышении температуры объекта до -90°C .

Уменьшение стабильного сигнала в этих экспериментах отражает, очевидно, уменьшение количества окисленных молекул P_{700} и связано, вероятно, с тем, что повышение температуры объекта приводит к размораживанию темных реакций переноса электрона от фотовосстановленных акцепторов к окисленному пигменту.

Перенос электронов от восстановленных акцепторов к окисленному P_{700} является, таким образом, температурно-зависимым процессом.

Это предположение подтверждают результаты дополнительно проведенных экспериментов, в которых было показано, что уменьшение стабильного сигнала при разогревании образцов, замороженных на свету, сопровождается появлением обратного фотоиндуцированного сигнала ЭПР.

Результаты этих экспериментов говорят также и о температурной зависимости процесса захвата электрона на молекулах акцепторов. Различный характер исчезновения стабильного сигнала при нагревании образцов, замороженных на свету или в темноте, указывает, по всей видимости, на существование целого ряда ловушек, отличающихся глубиной.

В заключение нужно отметить, что процессы, протекающие при низкой температуре, вероятно, не полностью соответствуют тому, что имеет место при физиологических условиях. Однако такой подход является удобным для разделения пигмент-акцепторных взаимодействий по их температурной зависимости.

Заключение

Проведенные в настоящей работе исследования фотоиндуцированных сигналов ЭПР зеленых растений и пурпурных фотосинтезирующих

бактерий показывают, что они связаны с участием фотоактивных пигментов P_{700} и $P_{870-890}$ в процессах электронного транспорта и не является следствием побочных реакций этих пигментов.

Величина фотоиндуцированных сигналов ЭПР определяется соотношением скоростей реакций транспорта электронов, приводящих к окислению и восстановлению фотоактивных пигментов. Об этом говорят изменения величины этих сигналов в присутствии ингибиторов фотосинтеза и при других воздействиях, влияющих на скорости электронтранспортных процессов.

Вместе с тем, сложный характер кинетики нарастания фотоиндуцированных сигналов ЭПР фотосинтезирующих организмов и зависимость этого процесса от времени темновой адаптации объекта указывает на влияние темновых процессов на окислительно-восстановительные превращения фотоактивных пигментов. Возможно, что кинетика накопления и стационарная концентрация окисленных форм фотоактивных пигментов зависят также и от содержания в клетках фотосинтезирующих организмов эндогенных восстановителей, накапливающихся в темноте.

Проведенные в работе исследования позволили установить, что поведение фотоиндуцированных сигналов ЭПР фотосинтезирующих организмов при отрицательных температурах определяется температурно-зависимыми процессами взаимодействия фотоактивных пигментов с акцепторами электрона. Сопоставление таких данных, полученных при изучении фотосинтезирующих бактерий и зеленых растений, указывает на существенные различия этих организмов на уровне первичных фотохимических процессов.

Выводы

1. Собран отражательный радиоспектрометр ЭПР 3-х сантиметрового диапазона, позволяющий проводить исследования на интактных биологических объектах, и разработана методика регистрации сигналов ЭПР, возникающих под действием света в клетках фотосинтезирующих

высоких. Величина обратимого уменьшается, а стабильного возрастает при повышении температуры.

Полученные закономерности отражают температурно-зависимые процессы переноса электронов между фотоактивными пигментами и акцепторами электронов. Рассматриваются возможные схемы этих процессов.

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

1. А.Б.Рубин, К.Н.Тимофеев. "Изучение образования фотоиндуцированного сигнала ЭПР в разных условиях освещения фотосинтезирующих объектов". Биофизика, т.13, вып.4, стр.637, 1968 г.
2. К.Н.Тимофеев. "О возможном участии двух пигментных систем в фотоиндуцированном появлении радикалов в листьях высших растений". Рефераты докл. научн. конф. мол. ученых МГУ. Изд-во МГУ, 1968, стр.171.
3. А.Б.Рубин, П.С.Венедиктов, А.А.Коновенко, Л.Б.Рубин, К.Н.Тимофеев. "О природе некоторых первичных процессов переноса электрона при фотосинтезе". Журн. прикл. спектроскопии, т.9, вып.3, стр.457, 1968 г.
4. К.Н.Тимофеев. "Образование свободнорадикальных продуктов в тканях фотосинтезирующих организмов под действием света различного спектрального состава при различных температурах". Научн. конф. мол. ученых, посв. 50-летию ВЛКСМ. Изд-во МГУ, 1968 г., стр.62.
5. К.Н.Тимофеев, А.Б.Рубин. "О связи фотоиндуцированного сигнала ЭПР с первичными процессами фотосинтеза высших растений". Биофизика, т.14, вып.6, стр.995-1000, 1969.
6. К.Н.Тимофеев. Исследование фотоиндуцированных сигналов ЭПР фотосинтезирующих организмов при низких температурах". IV Межд. Биофиз. конгр. Тез. семп. докл., т.1, стр.338, Москва, 72.

7. К.Н.Тимофеев, А.Б.Рубин. О кинетике фотоиндуцированного сигнала ЭПР фотосинтезирующих бактерий. Биофизика, т.16, вып.2, стр.348, 1971 г.
8. Л.Б.Рубин, Т.Е.Кренделева, В.З.Пашенко, П.В.Шанторенко, К.Н.Тимофеев, В.В.Петров, А.В.Иванов. "Действие излучения лазера на рубине на пигментный аппарат фотосинтезирующих организмов". Журн. прикл. спектроскопии, т.4, вып.1, стр.78, 1971 г.
9. К.Н.Тимофеев, А.Б.Рубин. "Изучение первичных процессов методом ЭПР". Сб. докладов Межд. симпозиума "Исследование свободнорадикальных состояний в связи с их ролью в регуляции биол. процессов". Пушкино, 1971 (в печати).
10. K.N. Timofeev, A.B. Rubin. "Connection between photoinduced paramagnetism and primary processes photosynthesis in green plants." VI Inter. Congr. of Photobiol. Bohum. 21-25 Aug. 1972, Book of Abstracts, Symposia and Contributed Papers. p.242.

высоких. Величина обратимого уменьшается, а стабильного возрастает при понижении температуры.

Полученные закономерности отражают температурно-зависимые процессы переноса электронов между фотоактивными пигментами и акцепторами электронов. Рассматриваются возможные схемы этих процессов.

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

1. А.Б.Рубин, К.Н.Тимофеев. "Изучение образования фотоиндуцированного сигнала ЭПР в разных условиях освещения фотосинтезирующих объектов". Биофизика, т.13, вып.4, стр.637, 1968 г.
2. К.Н.Тимофеев. "О возможном участии двух пигментных систем в фотоиндуцированном появлении радикалов в листьях высших растений". Рефераты докл. научн. конф. мол. ученых МГУ. Изд-во МГУ, 1968, стр.171.
3. А.Б.Рубин, П.С.Венедиктов, А.А.Кононенко, Л.Б.Рубин, К.Н.Тимофеев. "О природе некоторых первичных процессов переноса электрона при фотосинтезе". Журн. прикл. спектроскопии, т.9, вып.3, стр.457, 1968 г.
4. К.Н.Тимофеев. "Образование свободнорадикальных продуктов в тканях фотосинтезирующих организмов под действием света различного спектрального состава при различных температурах". Научн. конф. мол. ученых, посв. 50-летию ВЛКСМ. Изд-во МГУ, 1968 г., стр.62.
5. К.Н.Тимофеев, А.Б.Рубин. "О связи фотоиндуцированного сигнала ЭПР с первичными процессами фотосинтеза высших растений". Биофизика, т.14, вып.6, стр.995-1000, 1969.
6. К.Н.Тимофеев. Исследование фотоиндуцированных сигналов ЭПР фотосинтезирующих организмов при низких температурах". IV Межд. Биофиз. конгр. тез. секц. докл., т.1, стр.338, Москва, 72.

7. К.Н.Тимофеев, А.Б.Рубин. О кинетике фотоиндуцированного сигнала ЭПР фотосинтезирующих бактерий. Биофизика, т.16, вып.2, стр.348, 1971 г.
8. Л.Б.Рубин, Т.Е.Кренделова, В.З.Пашенко, П.В.Шанторенко, К.Н.Тимофеев, В.В.Петров, А.В.Иванов. "Действие излучения лазера на рубин на пигментный аппарат фотосинтезирующих организмов". Журн. прикл. спектроскопии, т.4, вып.1, стр.78, 1971 г.
9. К.Н.Тимофеев, А.Б.Рубин. "Изучение первичных процессов методом ЭПР". Сб. докладов Межд. симпозиума "Исследование свободнорадикальных состояний в связи с их ролью в регуляции биол. процессов". Пушкино, 1971 (в печати).
10. K.N. Timofeev, A.B. Rubin. "Connection between photoinduced paramagnetism and primary processes photosynthesis in green plants." VI Inter. Congr. of Photobiol. Bohum. 21-25 Aug. 1972, Book of Abstracts Simposia and Contributed Papers, p. 242.

ПОДП. К ПЕЧАТИ 29/Х-72 Г. Л-52922. Ф. 60 х 90 /16
ФКЗ.П.Л. 1,5. УЧ.-ИЗД.Л. 1,0. ЗАКАЗ 1620. ТИР. 200

ОТПЕЧАТАНО НА РОТАПРИНТАХ В ТИП. ИЗД. МГУ
МОСКВА, ЛЕНГОРЫ