«Биолог. ж. Армении», т. XXXV, № 5, 1982

УДК 541.144.7

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПАРАМАГНИТНЫЕ ЦЕНТРЫ И ЗАМЕДЛЕННАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ У ЛИСТЬЕВ БОБОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ АММИАКА

Дж. М. ДЖАВРШЯН, А. Н. ТИХОНОВ

Исследовали фотосинтетический электронный транспорт в листьях бобов методами электронного парамагнитного резонанса и замедленной флуоресценции в присутствии газообразного аммиака. Показано, что под действием аммиака происходит ингибирование электронного транспорта между фотосистемами. Выявлено возникновение в темноте дополнительного интенсивного сигнала электронного парамагнитного резонанса неизвестной природы.

Ключевые слова: замедленная флуоресценция, ЭПР, аммиак, электронный транспорт.

В настоящее время среди вредных веществ, загрязняющих воздух вблизи промышленных предприятий и химических комбинатов, не последнее место занимает аммиак. В связи с этим вопросу о механизме действия аммиака уделяется большое внимание.

Известно, что аммиак вызывает резкие изменения в фотосинтетическом аппарате, изменяет интенсивность и химизм фотосинтеза [3—6]. Вероятно, в основе этих функциональных изменений лежат ультраструктурные нарушения в фотосинтетических мембранах. Не случайно, что под действием аммиака происходит сильное увеличение светоабсорбции в сине-фиолетовой части спектра листьев [2] и нарушение состояния хлорофилла [1].

В настоящей работе приводятся данные о свободнорадикальных процессах и замедленной флуоресценции в листьях бобов под действием аммиака, что в свою очередь дает возможность проследить за изменением скорости электронного транспорта в мембранах хлоропластов in vivo.

Материал и методика. Объектом исследования служили 3-недельные проростки бобов. Свежесрезанный кусочек листа размером 3×20 мм подвергали воздействию газообразного аммиака, помещая его на 10 мин в эксикатор, имеющий объем 1600 см^3. Спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) регистрировали с помощью спектрометра Е-4 фирмы «Вариан» (США) при комнатной температуре при мощности СВЧ 10 мВт и амплитуде ВЧ модуляции 4Г. О кинетике фотоиндуцированных окислительно-восстановительных превращений реакционного центра фотосистемы 1 (Р 700) судили по величине сигнала ЭПР 1 от Р 700 + (рис. 1 А). Для этой цели магнитное поле фиксировали на низкопольном экстремуме производной сигнала ЭПР 1 (рис. 1 А). Источниками света служили две лампы накаливания (150 и 300 Вт), снабженные водными фильтрами, фокусирующими линзами и интерференционными светофильтрами фирмы «Карл Цейсс Йена» (ГДР)—SIF 707 ($\lambda_{макс}$ =707 нм, $\Delta\lambda_{1/2}$=5 нм) и IF 650 ($\lambda_{макс}$ = 650 нм, $\Delta\lambda_{1/2}$=7 нм). Для преимущественного возбуждения фотосистемы I использовали свет с $\lambda_{мак}{}^{c}$= 707 нм (свет λ_{707}), для возбуждения обеих фотосистем на фоне света λ_{707} включали свет с $\lambda_{макс}$ =650 нм или белый свет.

Замедленную флуоресценцию регистрировали на фосфороскопе, снабженном детектором ФЭУ-38, усилителем постоянного тока, осциллографом и самописцем КСП-4. Интенсивность возбуждающего света составляла $4 \cdot 10^4$ эрг/см^2 с.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 А показаны спектры ЭПР контрольного образца—листа бобов, не подвергнутого действию аммиака.

В темноте наблюдается спектр со слабо разрешенной сверхтонкой структурой (рис. 1 А, спектр 1), имеющий ширину $\Delta H_{макс} = 14$ Г (сигнал II); освещение листа светом λ_{707} приводит к появлению дополнительного, более узкого сигнала ЭПР ($\Delta H_{макс} \simeq 8$—9 Г) от $P\,700^+$ (рис. 1 А, спектр 2), (сигнал ЭПР I). После выключения света сигнал I спадает (рис. 2). Исследование кинетики фотоиндуцированных изменений сигнала ЭПР I дает важную информацию о функционировании цепи электронного транспорта хлоропластов [7—9]. На рис. 2 (кр. а) показана характерная кинетическая кривая изменений величины сигнала ЭПР I в контрольном образце. Включение света λ_{707} приводит к появлению сигнала I, при последующем включении на его фоне света λ_{650} вследствие притока электронов от фотосистемы II к $P\,700^+$, происходит уменьшение стационарной концентрации $P\,700^+$ (уменьшение сигнала I). Включение белого света, который, так же как и свет λ_{650}, возбуждает обе фотосистемы, но имеет большую интенсивность, сопровождается более сложными изменениями интенсивности сигнала ЭПР I. Из

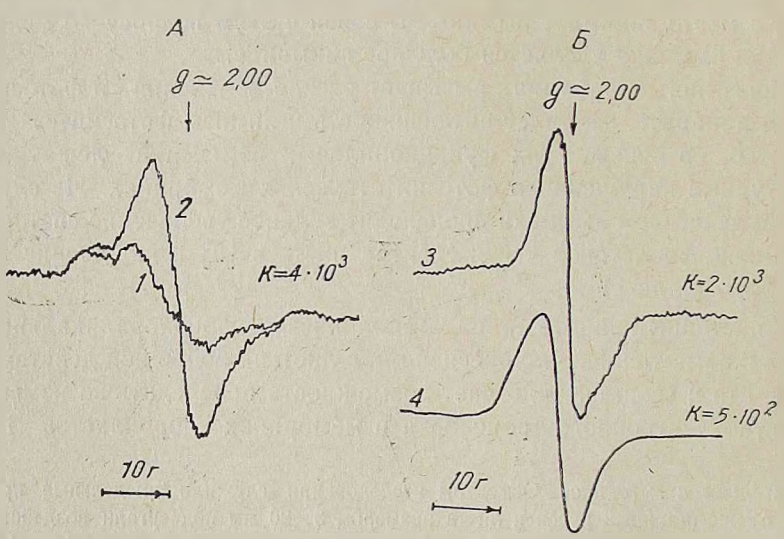

Рис. 1. Спектры ЭПР листьев бобов. А—Контроль (без обработки NH_3): 1—без освещения, 2—при освещении светом λ_{707}. Б—Сигналы ЭПР, наблюдаемые в темноте при обработке листа аммиаком: 1—0,62, 2—31,25 мг/л. Спектры ЭПР, записанные при различном коэффициенте усиления спектрометра: 1,2—$K=4\times10^3$; 3—$K=2\times10^3$; 4—$K=5\times10^2$.

рис. 2 (кр. а) видно, что вначале происходит уменьшение сигнала, которое затем сменяется увеличением. Детальное исследование этой кинетики показало, что сложность ее обусловлена, вероятно, двумя факторами: торможением электронного транспорта на участке между двумя фотосистемами и активацией электронного транспорта на акцепторном

участке фотосистемы I (подробнее об этом см. в работах [7—9]). Обработка листа аммиаком существенным образом меняет кинетическую картину. Из рис. 2 (кр. б и в) видно, что в образцах, обработанных аммиаком, происходит ингибирование электронного транспорта между фо-

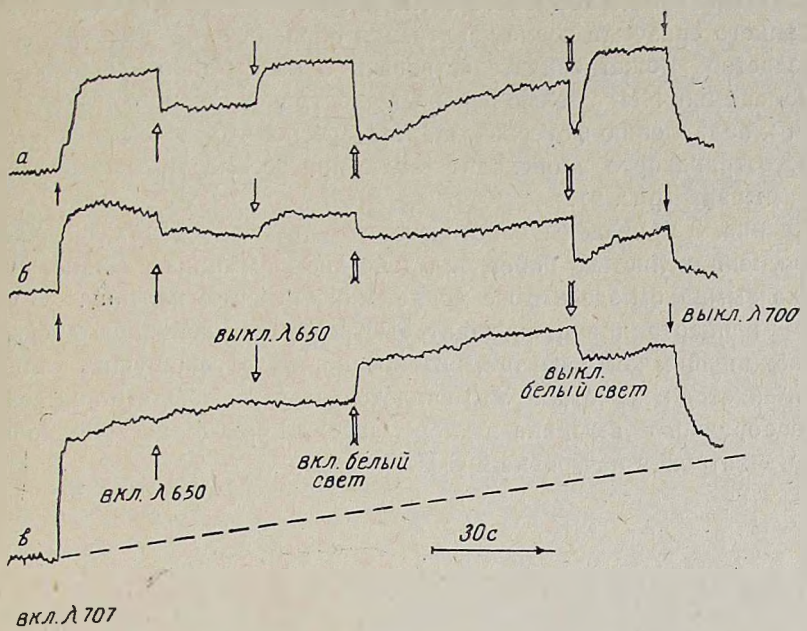

Рис. 2. Кинетика фотоиндуцированных изменений величины сигнала ЭПР ($g \simeq 2{,}00$) в листьях бобов: а) контроль; б) обработка листа 0,15 мг/л NH_3; в) обработка листа 6,25 мг/л NH_3.

тосистемами. Этот вывод следует из того, что включение на фоне света λ_{707} света λ_{650} или белого света, возбуждающего обе фотосистемы, не сопровождается уменьшением сигнала ЭПР I. Включение достаточно интенсивного белого света приводит лишь к увеличению сигнала ЭПР. Заметный на рис. 2 дрейф нулевой линии (показано пунктиром) не связан с действием света на величину сигнала I, а обусловлен увеличением интенсивности сигнала ЭПР, появляющегося в результате обработки листа аммиаком. Специальные опыты показали, что со временем происходит усиление этого сигнала (как в темноте, так и при действии света).

Обработка листа аммиаком, как было обнаружено нами в настоящих исследованиях, приводит к возникновению в темноте дополнительного довольно интенсивного сигнала ЭПР (рис. 1 Б), имеющего ширину $\Delta H_{макс} \simeq 8$ г, его интенсивность на порядок выше интенсивности сигнала ЭПР I от $P700^+$, регистрируемого в контрольных образцах при освещении листа светом λ_{707}. В настоящее время нельзя дать однозначного ответа о природе обнаруженного нами сигнала ЭПР. Ясно, однако, что он отличается от сигнала ЭПР, принадлежащего окисленным центрам $P700^+$, так как имеет несколько меньшую ширину. Нельзя исключить, что этот сигнал представляет собой суперпозицию нескольких сигналов, обусловленных парамагнитными центрами различного происхождения. В пользу этого предположения указывает тот факт, что

форма сигнала, возникающего в результате обработки листа аммиаком, несколько изменяется в зависимости от концентрации NH_3 (рис. 1 Б, ср. спектры 1 и 2). Обращает на себя внимание также тот факт, что дополнительный сигнал ЭПР появляется после обработки листа довольно низкими концентрациями газообразного аммиака. Существует зависимость интенсивности темнового сигнала ЭПР от концентрации аммиака, записанного сразу же после извлечения образца из эксикатора. Это обстоятельство может свидетельствовать о каком-либо специфическом взаимодействии NH_3 с целью переноса электронов в хлоропластах, приводящем к подавлению фотосинтеза. Интересно, что ингибирование электронного транспорта происходит также при весьма низких концентрациях аммиака (рис. 2).

На рис. 3 приведены кинетические кривые затухания замедленной флуоресценции листьев бобов под действием аммиака. Видно, что обработка аммиаком здесь тоже меняет кинетическую картину. С увеличением концентрации происходит быстрое уменьшение интенсивности короткоживущих компонентов, интенсивность долгоживущих компонентов изменяется незаметно. Это свидетельствует о том, что под действием газообразного аммиака в хлоропластах происходит блокирование потока электронов на уровне ФС-II.

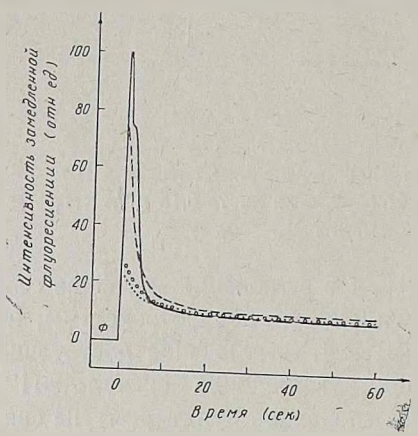

Рис. 3. Зависимость кинетических кривых затухания замедленной флуоресценции в листьях бобов от концентрации NH_3. Ф — фон фосфороскопа, —— контроль (без обработки NH_3), - - - - - 1,156 мг²/л, ооооо 2,890 мг²/л, ····· 5,780 мг²/л.

Полученные методом замедленной флуоресценции результаты подтверждаются данными, полученными методом ЭПР. И те и другие свидетельствуют об ингибировании электронного транспорта между фотосистемами.

Что касается обнаружения дополнительного интенсивного сигнала ЭПР, возникающего в темноте, то это, возможно, связано с наличием неизвестного вещества, вызывающего сильное увеличение поглощения в сине-фиолетовой области спектра под действием аммиака [2].

Таким образом, при обработке листьев аммиаком ультраструктурные перестройки происходят не только в пигментных структурах мембран тилакоидов [1], но и в компонентах электронного транспорта, в результате чего нарушается транспорт электронов между фотосистемами.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова, физический факультет,
Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 21.IX 1981 г.

ԱԶԱՏ ՌԱԴԻԿԱԼԱՅԻՆ ՊԱՐԱՄԱԳՆԻՍԱԿԱՆ ԿԵՆՏՐՈՆՆԵՐԸ ԵՎ ԴԱՆԴԱՂԵՑՎԱԾ ՖԼՈՒՈՐԵՍՑԵՆՑԻԱՆ ԲԱԿԼԱՅԻ ՏԵՐԵՎՆԵՐԻ ՄՈՏ ԱՄՈՆԻԱԿԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՏԱԿ

Ջ. Մ. ՋԱՎՐՇՅԱՆ, Ա. Ն. ՏԻԽՈՆՈՎ

Էլեկտրոնային պարամագնիսական ռեզոնանսի և դանդաղեցված ֆլուորեսցենցիայի մեթոդներով ուսումնասիրվել է բակլայի տերևներում էլեկտրոնային տրանսպորտի խանգարումը գազանման ամոնյակի ազդեցությամբ։ Ցույց է տրված, որ ամոնյակի ազդեցության հետևանքով տեղի է ունենում էլեկտրոնների տրանսպորտի խախտում երկու ֆոտոհամակարգերի միջև։ Ամոնյակի ազդեցության ժամանակ մթության մեջ նկատվել է անհայտ բնույթի լրացուցիչ ինտենսիվ ԷՊՌ-ի ազդանշան։

FREE RADICAL PARAMAGNETIC CENTRES AND BEAN LEAF DELAYED FLUORESCENCE WHEN AFFECTED BY AMMONIA

J. M. DZHAVRSHIAN, A. N. TIKHONOV

Photosynthetic electron transport in bean leaves has been studied using the methods of electron paramagnetic resonance and delayed fluorescence in the presence of gaseous ammonia.

It has been shown that inhibition of electron transport between photosystems is achieved when affected by ammonia. Appearance of additional intensive EPR signal of unknown nature in the darkness has been established.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Джавршян Дж. М.* Уч. зап. Казанск. госуниверситета, *124,* 7, 1965.
2. *Джавршян Дж. М.* Автореф. канд. дисс., Казань, 1967.
3. *Марценюк В. Б.* Автореф. канд. дисс., Казань, 1978.
4. *Попов В. А.* Автореф. канд. дисс., Донецк, 1975.
5. *Сиянова Н. С.* и *Джавршян Дж. М.* Тез. докл. Второй конф. физиологов и биохимиков растений Сибири и Дальнего Востока. Иркутск, 1964.
6. *Сиянова Н. С.* Автореф. канд. дисс., Казань, 1965.
7. *Тихонов А. Н., Рууге Э. К., Субчинский В. К., Блюменфельд Л. А.* Физиол. раст., *22,* 1, 5—15, 1975.
8. *Тихонов А. Н., Рууге Э. К.* Биофизика, *20,* 6, 1049—1053, 1975.
9. *Тихонов А. Н., Рууге Э. К.* Биофизика, *20,* 6, 1054—1058, 1975.