

УДК 541.144.7

Физико-химические исследования механизмов и регуляции фотосинтеза высших растений

1. Термовысвечивание в исследовании фотосинтеза

А. К. Кукушкин, С. А. Кузнецова

АЛЕКСАНДР КОНСТАНТИНОВИЧ КУКУШКИН — доктор физико-математических наук, профессор кафедры биофизики Физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов: биофизика фотосинтеза, квантовая химия, математическое моделирование.

СОФЬЯ АЛЕКСЕЕВНА КУЗНЕЦОВА — кандидат физико-математических наук, стажер Химического факультета Лейденского университета, Нидерланды. Область научных интересов: биофизика фотосинтеза, биохимия ферментов, оптическая и радиоспектроскопия.

119992 Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова, Физический факультет, E-mail kukushkin@phys.msu.ru

Введение

К концу XX века достигнуты существенные успехи в исследовании фотосинтеза. Выявлены химический состав и пространственная организация компонент фотосинтетического аппарата. Описана последовательность фотофизических процессов и биохимических реакций — от поглощения квантов света до образования углеводов. На качественном уровне идентифицированы физические механизмы миграции энергии, разделения зарядов и переноса электронов в фотосинтезирующих системах.

Определены характерные времена протекания первичных процессов фотосинтеза и восстановительного пентозофосфатного цикла. С помощью рентгеноструктурного анализа расшифрована структура реакционного центра пурпурных бактерий и комплекса фотосистемы 2 (ФС 2) зеленых водорослей, а также структура и механизм работы АТФ-синтазы.

Однако до настоящего времени еще не создана количественная теория, устанавливающая связь между скоростями отдельных этапов фотосинтеза и свойствами участвующих в них молекул. Кроме того, нет количественной теории, описывающей регуляцию отдельных этапов фотосинтеза и процесса в целом.

В данной статье представлены работы, выполненные в последние годы на кафедре биофизики МГУ им. М.В. Ломоносова по исследованию еще не до конца выясненных процессов и механизмов, реализуемых в

фотосинтезе. Исследования проводились путем изучения люминесцентных свойств фотосинтезирующих объектов, а также с помощью моделей, развитых на кафедре. В первой части статьи рассмотрены результаты исследований цепи электронного транспорта высших растений, во второй части работы — результаты исследований регуляции фотосинтеза высших растений.

Исследование термовысвечивания фотосинтезирующих объектов (краткий обзор работ)

Впервые попытку исследовать фотосинтезирующие объекты методом термовысвечивания (термолюминесценции) предприняли Арнолд и Шервуд [1, 2]. Они обнаружили свечение высушенных хлоропластов с максимумом в области 120—130 °С. Дальнейшее развитие этой работы в исследованиях Л.А. Тумермана с сотруд. [3] позволило установить, что термовысвечивание с максимумами 120—130 °С и 240—260 °С имеет место лишь в атмосфере кислорода и представляет собой термохемилюминесценцию, возникающую при тепловой активации реакций гидропероксидов с хлорофиллом, а также процессов рекомбинации пероксидных радикалов. В работе А.А. Красновского и Ф.Ф. Литвина [4], исследовавших термохемилюминесценцию ацетоновых и спиртовых растворов хлорофилла в атмосфере кислорода, была показана роль триплетных состояний хлорофилла в этом процессе.

Арнолд обнаружил также низкотемпературную термолюминесценцию листьев зеленых растений и хлореллы [5]. На кривой термовысвечивания наблюдались пять максимумов. Четыре максимума (-155 , -6 , 30 и 52 °С) автор обозначил как Z, A, B и C. Температура пятого максимума лежит в пределах от 30 до 100 °С (Арнолд не ввел специального обозначения этого максимума). Исследования природы максимумов дали следующие результаты. Максимум Z возбуждается синим светом и сохраняется после предварительного нагрева объекта до 100 °С в течение 5 мин. Пятый максимум (между 30 и 100 °С) в отличие от остальных максимумов не зависит от скорости нагрева и наблюдается лишь в присутствии кислорода. Максимумы A, B и C исчезают после предварительного нагрева исследуемых образцов до 55 °С. Обработка объекта диуроном* (ингибитор электронного транспорта) не приводила к уменьшению максимумов A и C. Максимумы A, B и C не наблюдались у мутанта водоросли *Scenedesmus*, не имеющего ФС 2.

Для объяснения термолюминесценции и замедленной люминесценции (послесвечение — свечение, продолжающееся после прекращения возбуждения светом) листьев Арнолд и Аззи [6] предложили полупроводниковую модель. По их мнению, свечение возникает при тепловой активации и последующей рекомбинации свободных электронов и дырок, при этом появление максимумов A и C связано с освобождением дырок, а максимума B — электронов.

В последующих исследованиях различных компонентов послесвечения зеленых листьев Арнолд и Аззи обнаружили четыре компонента замедленной люминесценции. Компоненту с характеристическим временем от 1 до 100 мс наблюдали при температуре жидкого азота. Ее интенсивность пропорциональна квадрату интенсивности света возбуждающей вспышки [7]. Обработка образцов феррицианидом (окислитель, применяемый при исследовании фотосинтеза) увеличивает интенсивность послесвечения [8]. Предполагалось, что эта компонента возникает при рекомбинации в ФС 2 свободных электронов и дырок, генерируемых при поглощении двух квантов света. Замедленная люминесценция с характеристическим временем более 1 с линейно зависит от интенсивности возбуждающей вспышки. При температуре жидкого азота эта компонента не наблюдается. Энергия активации термовысвечивания для компонент со временем свечения более 1 с согласуется с энергией активации пиков A, B и C. Это привело к предположению о том, что в основе термовысвечивания и замедленной люминесценции лежит один и тот же процесс. На основании результатов опытов, проведенных методом флеш-фотолиза, Арнолд пришел к выводу о том, что максимумы термовысвечивания A, B и C обусловлены термическим освобождением дырок от выделяющего кислород реакционного центра люминесценции и их рекомбинации со свободными электронами хлорофилла. Арнолд отмечает также наличие и других компонент послесвечения [6].

Полупроводниковая гипотеза механизма термолюминесценции встречает ряд трудностей. Наличие полупроводниковых свойств комплексов пигментов не

является доказанным [9]. В модельных соединениях похожей структуры квантовый выход фотоэффекта оказывается не очень высоким [10, 11]. Кроме того, для полупроводниковой гипотезы Арнолда существенно наличие двух пространственно разделенных фотосистем, поэтому в бактериях, содержащих лишь одну фотосистему, не должна наблюдаться термолюминесценция. Однако это противоречит результатам работ Флейшмана [12—14], в которых обнаружены и исследованы термовысвечивание и замедленная люминесценция бактерий.

Бертч с соавт. для объяснения своих экспериментальных результатов предложил несколько измененную полупроводниковую гипотезу [15—17], но она обладает теми же недостатками, что и гипотеза Арнолда.

В работах Мара и Стеси с соавт. [18, 19] объяснение механизмов термовысвечивания и замедленной люминесценции, возникающих после нагревания скачком предварительно облученных хлоропластов или хлореллы, основано на механизме аннигиляции триплетных экситонов. Однако данные по флеш-фотолизу и отсутствие замедленной люминесценции у хлорофилла *a* [20] ставят под сомнение участие триплетных состояний в естественных процессах фотосинтеза. Мар и Говинджи [18] для объяснения термовысвечивания, возникающего под влиянием скачка температуры, также привлекли представления о триплет-триплетной аннигиляции. На основании опытов с использованием диурана и гидроксилamina (доноры электронов на донорной стороне реакционных центров в ФС 2) Юрсиак и Говинджи [21] предположили, что свечение появляется в ходе обратной реакции окисленного первичного донора электронов в ФС 2 (Z^+) с некоторым восстановленным компонентом.

Весьма обстоятельно термовысвечивание и замедленная люминесценция фотосинтезирующих объектов были исследованы в работах Ф.Ф. Литвина и В.А. Шувалова [22, 23]. Объектами исследований служили листья фасоли, элодеи и трианеи, а также суспензии зеленых, синезеленых водорослей и зеленых фотосинтезирующих бактерий. В своих экспериментах авторы наблюдали пять компонент послесвечения и три пика термолюминесценции при -160 , -15 и 20 °С, происхождение которых они объяснили наличием ловушек электронов и дырок в реакционном центре ФС 1 и ФС 2. Компонент 3 (длительность послесвечения $\tau = 1,7$ с, $\lambda_{\text{возб}} = 640$ нм) подавлялся кислородом, хиноном и диуроном. На основании сравнения спектральных характеристик и энергий активации термовысвечивания был сделан вывод о том, что этот компонент и максимум при -15 °С возникают при высвобождении носителей зарядов из одной и той же ловушки L_2 , которая связана с ФС 2 и имеет энергию активации $0,35$ эВ (определена по зависимости интенсивности послесвечения от T^{-1}). Компонент 4 ($\tau = 1,6$ с, $\lambda_{\text{возб}} = 700$ нм) усиливался под действием диурана и был нечувствителен к кислороду. Авторы предположили, что возникновение этого компонента и пика термовысвечивания при 20 °С обусловлено освобождением ловушки L_3 , находящейся в фотосистеме 1 (ФС 1). Компонент 5 ($\tau = 10-15$ с) наблюдался только при положительных температурах и только в присутствии кислорода. Авторы полагают, что он возникает при хемилюминесценции в ходе обратных реакций

* N'-(3,4-дихлорфенил)-N,N-диметилмочевина.

окисления фотовосстановленных форм хлорофилла в растворе.

К моменту публикации вышеупомянутых работ оставался неясным механизм образования первоначальных состояний, ответственных за термолюминесценцию фотосинтезирующих объектов. Они могли образоваться как в результате электронного переноса при возбуждении молекул светом, так и при фотохимическом окислении молекул пигментов. Этот вопрос был выяснен в работе [24], в которой было показано, что термолюминесценция зеленого листа возникает и при облучении его в вакууме при температуре жидкого азота. Это значит, что состояния, отвечающие за термолюминесценцию, возникают в результате переноса электронов, так как фотохимическое окисление в вакууме при низкой температуре не происходит.

Новые представления о природе ловушек электронов (дырок) были высказаны А.Б. Рубиным и П.С. Венедиктовым [25—28]. Они предположили, что роль ловушек, на которых локализуются электроны, играют переносчики фотосинтетической цепи электронного транспорта. Объектами их исследований служили листья высших растений и зеленые водоросли. Если образец одновременно облучали и охлаждали до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, то при последующем нагревании регистрировали три максимума термолюминесценции при -10 , 10 и $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Если образец охлаждали до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, а затем освещали при этой же температуре, то обнаруживался лишь один максимум при $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Было предложено следующее объяснение этих результатов. В случае одновременного охлаждения и облучения объектов происходит постепенное восстановление нескольких переносчиков электронов между двумя фотосистемами, и каждый из пиков на кривой термовысвечивания соответствует определенному восстановленному переносчику. Во втором случае, когда объект освещали после его охлаждения, восстанавливаются только первичные акцепторы электронов в ФС 2. При нагревании имеет место прежде всего транспорт электронов с первичных акцепторов до переносчиков в конце цепи (более глубоких ловушек), а затем обратный перенос электронов и последующая их рекомбинация с окисленными донорами электронов. Опыты с диуроном подтвердили такую интерпретацию. В дальнейшем эти ученые подробно исследовали также послесвечение и сделали вывод о том, что это явление возникает в ходе обратных реакций рекомбинации электронов и восстановленных электронных переносчиков в транспортной цепи.

Весьма интересной с этой точки зрения представляется работа Флейшмана [12]. При одновременном охлаждении до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ и облучении бактерий *Rhodospseudomonas viridis* появляется пик при $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и широкая полоса, возрастающая при повышении температуры, наблюдавшаяся в присутствии кислорода. В случае охлаждения бактерий до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ кривая термовысвечивания имеет тот же вид. При охлаждении образца в темноте интенсивность максимума при $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ зависит от температуры облучения. Зависимость имеет максимум при $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ и обращается в нуль при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Это связано с тем, что в данном объекте реакционный центр P_{985} (бактериохлорофилл, имеющий максимум поглощения при 985 нм) при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ уже не окисляется. Флейшман полагает, что термовысвечивание

появляется в результате обратного переноса электрона на окисленный реакционный центр P_{985}^{+} . Первичный акцептор электронов непосредственно не связан с этим явлением, однако обратный электронный перенос происходит через первичный акцептор.

Термовысвечивание фотосинтезирующих объектов исследовали также индийские ученые [29, 30]. При охлаждении объектов на свету до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ были получены следующие максимумы: $-155\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Z-пик), $-37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (пик 1), $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ (пик 2), $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (пик 3), $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (пик 4) и $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ (пик 5). Интенсивность пика 1 мала и его природа не обсуждается. Пик Z возбуждается синим светом, он появлялся при люминесценции инактивированных хлоропластов. Интенсивность пика 2 увеличивается при добавлении диурана, его появление коррелирует с окислением первичного акцептора электронов в ФС 2. Пик 5 возбуждается красным светом в дальней области спектра, возрастает при обработке диуроном и нечувствителен к тепловой обработке. По мнению авторов, этот пик связан с обратным переносом электронов с акцепторов в ФС 1. Максимумы 3 и 4 связаны с электронным транспортом и конформационными перестройками мембраны хлоропластов и их можно ингибировать диуроном. В последней работе [31] эти же авторы изучили субхлоропластные частицы (входят в состав хлоропластов) и подтвердили, что обе фотосистемы участвуют в процессе термолюминесценции. Они отметили также роль первичных и вторичных акцепторов ФС 2 и S-состояний системы разложения воды (дискретные состояния комплекса разложения воды высших растений S_i ($i = 0, 1, 2, 3, 4$), возникающие под действием коротких импульсов (мкс) видимого света).

Лури и Бертч [32, 33] при исследовании хлоропластов получили четыре максимума: пик в области $-140 \div -180\text{ }^{\circ}\text{C}$, пик 1 ($8\text{ }^{\circ}\text{C}$), пик 2 ($20\text{--}35\text{ }^{\circ}\text{C}$) и пик 3 ($40\text{--}50\text{ }^{\circ}\text{C}$). Показано изменение интенсивности пиков при добавлении в исследуемую систему акцепторов электронов и ингибиторов фотосинтеза. Субхлоропластные частицы, содержащиеся в основном ФС 2, давали более сильную флуоресценцию, чем частицы, обогащенные ФС 1. Максимум, появляющийся при низкой температуре ($-140 \div -180\text{ }^{\circ}\text{C}$), Лури и Бертч связывают непосредственно с фотосинтетическими процессами. Энергия активации составила $0,8\text{ эВ}$ для максимума 1; $0,4\text{ эВ}$ для максимума 2; $0,57\text{ эВ}$ для максимума 3. Термолюминесценцию Лури и Бертч связывают с обратным переносом электрона как с первичных, так и с вторичных акцепторов.

Природа окисленных компонентов, принимающих участие в процессах термовысвечивания и послесвечения, проанализирована в обширной серии работ японских ученых [34—40]. Ичикава с соавт. [34] изучал термовысвечивание листьев, хлоропластов и субхлоропластных частиц покрытосеменных растений. Образцы облучали при $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ и нагревали со скоростью 30 град/мин . Получены четыре пика: при $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (пик A), $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (пик V_1), $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (пик V_2), $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ (пик C) и пик Z_V , температура которого линейно зависит от температуры облучения в интервале от -55 до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. При обработке, вызывающей инактивацию системы с выделением кислорода, пики A, V_1 и V_2 значительно уменьшались. Субхлоропластные частицы, обогащенные ФС 2 путем обработки тритоном X-100, при до-

бавлении инактивированной кислородвыделяющей системы, давали только пики Z_V и A , а субхлоропластные частицы, обогащенные ФС 1, показали только максимум C . При реактивации красным светом кислородвыделяющей системы этиолированных листьев (выращенные в темноте листья, лишённые хлорофилла) на кривой термовысвечивания появлялись пики A , B_1 и B_2 . На основании этих опытов авторы предположили, что максимумы A , B_1 и B_2 связаны с системой, выделяющей кислород. Что касается природы максимума Z_V (температура, при которой он возникает, линейно зависит от температуры облучения), то на основании анализа спектра возбуждения и зависимости интенсивности от температуры возбуждения авторы предположили, что Z_V -пик является либо частью неэлементарного Z -пика Арнолда [6, 8], либо он соответствует компоненту 1 Литвина и Шувалова [23]. Первое предположение согласуется с результатами работы [31]. Ичикава с коллегами [34] подобно авторам работ [1, 29, 30, 32, 33] не связывает Z_V -пик с процессами фотосинтеза.

Гипотеза об участии комплекса, выделяющего кислород, в термолюминесценции подтверждена в работе [35], проведенной на листьях голосемянных растений. На основании опытов с освещением этиолированных листьев отдельными вспышками и с использованием дефицитных по марганцу водорослей и хлоропластов в работах [36–38] пришли к заключению, что роль дырок в процессе термолюминесценции могут играть ионы марганца. Показано существование осцилляций интенсивности пиков A и B в случае специальных условий облучения фотосинтезирующей системы короткими насыщающими вспышками [39]. В этих экспериментах были получены зависимости от температуры вероятности переходов между S -состояниями для различных S -состояний комплекса разложения воды. Подробно качественные аспекты применения метода термовысвечивания к фотосинтезирующим организмам описаны в обзоре [40].

Суммируя результаты описанных выше работ, отметим следующее. Термовысвечивание листьев высших растений вызвано рекомбинацией положительных зарядов, стабилизированных на окисленных электронных переносчиках на донорной стороне реакционного центра фотосистемы 2, с отрицательными зарядами восстановленных переносчиков на акцепторной стороне (первичного или вторичного хинонного акцептора). К настоящему времени экспериментально выяснена природа многих пиков термолюминесценции, т.е. определены места локализации положительных и отрицательных зарядов, рекомбинация которых приводит к образованию данного пика.

Вместе с тем применение термолюминесценции для изучения состояния ФС 2 ограничивается рядом существенных проблем. Одна из таких проблем связана с тем, что классификация пиков производится по их температуре, однако максимумы с одним и тем же положением, вообще говоря, могут быть вызваны рекомбинацией различных пар зарядов в зависимости от температуры и характера возбуждения. Поэтому в ряде случаев без дальнейшего исследования или дополнительных предположений нельзя выяснить, какой из пиков с близкими температурами наблюдается в данном эксперименте и, следовательно, рекомбинации

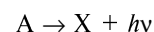
какой пары зарядов следует приписать наблюдаемый максимум. Другая проблема заключается в том, что кривая термовысвечивания имеет сложный характер и часто является суммой нескольких перекрывающихся пиков, поэтому разложение экспериментально полученной кривой термовысвечивания на отдельные компоненты представляет непростую задачу.

Разрешению второй и отчасти первой проблемы может способствовать построение моделей термолюминесценции листьев высших растений.

Модели термовысвечивания высших зеленых растений

Рассмотрим основные теоретические модели, применяемые для объяснения результатов, полученных при исследовании фотосинтеза.

Модель Рэндалла–Уилкинса базируется на реакции



где A — компонент, запасующий световую энергию, который при нагревании распадается с излучением кванта света.

Эта модель была разработана для описания термолюминесценции кристаллофосфоров, для которых характерна мономолекулярная кинетика распада без повторного захвата электронов [41].

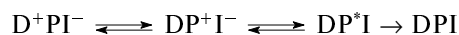
Модель, предложенная де Вольтом с соавт. [42], позволяющая учесть повторный захват электронов, исходит из реакции:



где A и B — компоненты, запасующие световую энергию.

Эта модель была применена для объяснения кинетики термовысвечивания в фотосинтезирующих системах. Модель, предложенная В.Н. Харкяненом и Л.Н. Христофоровым [43], также учитывающая повторный захват (повторное заселение метастабильного состояния), включает реакционный центр P_{680} — первичный и вторичный акцепторы электронов ФС 2. Отметим, что в этих моделях не учитывалось состояние электронных переносчиков на донорной стороне ФС 2, участие которых в термолюминесценции экспериментально показано японскими учеными [32–40].

Модель, предложенная А.К. Кукушкиным и Л.В. Новиковой [44], описывает термовысвечивание фотосинтетической системы, которая может быть представлена следующей схемой реакций



где D , I — первичный донор и первичный акцептор электронов; P — специальная пара P_{680} реакционного центра ФС 2 высших растений и водорослей.

Похожая схема была рассмотрена А.В. Клеваником [45]. Расчет энергии активации термовысвечивания в рамках данной схемы рекомбинации показывает, что она описывает низкотемпературный пик термолюминесценции. Модель, аналогичная предложенной в [44, 45], использована Клеваником для выяснения природы полосы термовысвечивания при -55°C [46].

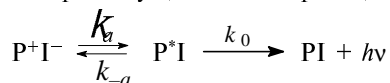
Все приведенные выше схемы рекомбинации описывают лишь одиночный пик на кривой термовысвечивания, так что остается неразрешенной проблема описания множественности люминесцентных полос.

Для интерпретации многокомпонентной кривой термовысвечивания Клеваником предложена схема

состояний реакционного центра ФС 2 с двумя независимыми конкурирующими донорами электронов, а также учитывающая первичный и вторичный хиноновые акцепторы [45]. Такая схема действительно позволяет описать двухкомпонентную кривую термолюминесценции, хотя маловероятно, что множественность пиков при температуре выше -20°C и в нормальных условиях можно объяснить участием нескольких электронных доноров для реакционного центра P_{680}^+ специальной пары фотосистемы 2.

В нашей группе была разработана более общая модель термолюминесценции высших растений, учитывающая состояния следующих компонентов электрон-транспортной цепи: S-состояний водородсодержащего комплекса, тирозина — первичного донора электронов в реакционном центре ФС 2 P_{680} , феофитина — первичного акцептора электронов в ФС 2, первичного и вторичного хиноновых акцепторов Q_A и Q_B [47]. Существенно новой чертой этой модели по сравнению с описанными выше является то, что она учитывает связи между люминесцентными пиками. Эта связь обусловлена тем, что в некоторых случаях состояние, в которое переходит реакционный центр после рекомбинации зарядов с донорной и акцепторной сторон и излучения кванта света, само может служить источником рекомбинационной люминесценции при дальнейшем нагревании фотосинтезирующей системы.

В рамках модели [47] для фотосинтезирующей системы, в которой осуществляется реакция

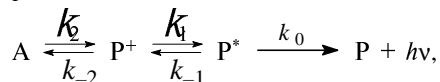


интенсивность термовысвечивания рассчитывается по следующему уравнению

$$I(T) = p_0^+ \frac{k_a k_0}{k_0 + k_a} \exp\left(-\frac{\Delta E_a}{kT}\right) \exp\left(-\frac{1}{\beta} \frac{k_a k_0}{k_0 + k_a} \int_{T_0}^T \exp\left(-\frac{\Delta E_a}{kT'}\right) dT'\right)$$

где p_0^+ — вероятность обнаружения реакционного центра в состоянии P^+I^- в начальный момент времени; ΔE_a — энергия активации реакции; β — скорость нагревания образца.

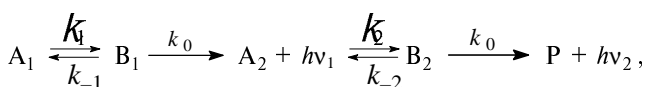
Систему, учитывающую большее число переносчиков электронов



можно свести к предыдущей модели введением эффективных величин

$$k_a = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} \text{ и } k_{-a} = \frac{k_{-1} k_{-2}}{k_{-1} + k_2}$$

Для учета связи между пиками термолюминесценции, реализуемой по схеме



будем считать, что не все реакционные центры, перешедшие из состояния B_1 в состояние A_2 , а только их часть, равная $0 < K < 1$, участвуют в повторной рекомби-

нации. В этом случае выражение для интенсивности второго пика термолюминесценции, обусловленного переходом из состояния B_2 , имеет вид:

$$I_2(t) = \frac{k_0 k_{-2}}{k_0 + k_2} \exp\left(-\int_0^t \frac{k_0 k_{-2}}{k_0 + k_2} dt'\right) \left[y_3(0) + K \int_0^t \exp\left(\int_0^{t'} \frac{k_0 k_{-2}}{k_0 + k_2} dt''\right) I_1(t'') dt' \right]$$

Величина t обозначает время, причем $t = 0$ соответствует времени начала нагрева. Величина $y_3(0)$ равна вероятности нахождения комплекса реакционного центра в состоянии A_2 в момент времени $t = 0$. Эта формула отражает связь между пиками: интенсивность второго пика зависит не только от начальной концентрации соответствующих состояний реакционного центра, но и от начальной концентрации состояний, отвечающих за пик интенсивностью I_1 , и значения K — константы связи между пиками. Константа K учитывает безызлучательную дезактивацию состояний реакционного центра ФС 2, отвечающих за термолюминесценцию: доля реакционных центров, перешедших из состояния B_1 в A_2 и дезактивированных безызлучательно, равна $1 - K$. Безызлучательную дезактивацию в реакционных центрах, изначально находившихся в состояниях A_1 и A_2 , можно учесть при выборе начальных условий. Для этого будем считать $y_1(0)$ и $y_3(0)$ равными вероятностям того, что реакционный центр термолюминесценции находится в начальный момент в состоянии A_1 (A_2), и в нем будет происходить излучательная рекомбинация. В этом случае сумма $\sum_i y_i$ не строго равна единице: $0 \leq \sum_i y_i \leq 1$.

Вывод приведенных формул дан в работе [47].

Процесс оценки приближения экспериментальных кривых термовысвечивания к теоретическим можно представить в виде следующих этапов.

1. В зависимости от условий возбуждения фотосинтезирующего объекта выделяются те начальные состояния реакционного центра ФС 2, рекомбинация зарядов в которых в данных условиях может быть источником термовысвечивания. Исходя из известных оценок соотношений $\text{S}_1 : \text{S}_0$ и $\text{Q}_\text{B} : \text{Q}_\text{B}^-$ после темновой адаптации, можно предварительно оценить относительные заселенности выделенных состояний. Процедура такой оценки описана в работах [48, 49].

2. Для выделенных начальных состояний составляется подробная схема реакций рекомбинации. В том случае, когда при рекомбинации зарядов в одном из состояний реакционного центра получается состояние, в котором заряды в свою очередь могут рекомбинировать с испусканием термолюминесценции, необходимо ввести коэффициенты связи между соответствующими состояниями. Затем составляется общая схема переходов между возможными состояниями реакционного центра в данных условиях с учетом связи между состояниями. Подробно эта операция описана в [49].

3. На основании полученной схемы определяется конкретный вид аналитической зависимости интенсивности каждой из полос термолюминесценции от температуры. Температурная зависимость полной интенсивности термовысвечивания определяется как сумма интенсивностей термолюминесценции в результате рекомбинации в отдельных состояниях реакционного центра.

4. Путем варьирования параметров модели определяется наилучшее приближение экспериментальной кривой к теоретической. При этом сначала, варьируя энергию активации обратных реакций электронного транспорта, выбирают температуру максимумов каждого из пиков, затем при изменении начальных заселенностей и констант связей между пиками добиваются наилучшего приближения соотношения интенсивностей отдельных пиков.

Разработанная нами модель может быть использована для анализа экспериментально полученных кривых термофлуоресценции и разложения их на отдельные компоненты, для оценки изменения энергий активации отдельных реакций, обусловленных обратным электронным переносом, начальных заселенностей состояний и коэффициентов связи между пиками под действием различных внешних факторов.

Пример приближения экспериментальных кривых к теоретическим, проведенного на основании изложенных предположений, представлен на рис. 1. На рисунке показаны кривые термолюминесценции здоровых и зараженных серой гнилью (заболеванием, вызываемым широко распространенным грибковым патогеном *Botrytis cinerea*) трехнедельных растений бобов (*Vicia faba*, вид Русские черные). Рис. 1а демонстрирует наилучшее теоретическое приближение соответствующих кривых результатам численного интегрирования формул. Сравнение теоретических кривых с экспериментальными показывает, что такое приближение приводит к удовлетворительному соответствию

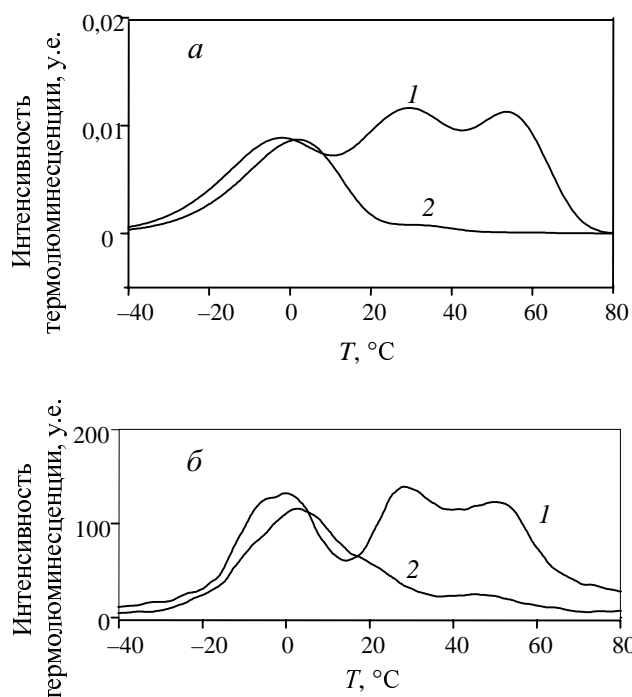


Рис. 1. Теоретическая и экспериментальная кривые термофлуоресценции трехнедельных листьев бобов первого яруса здоровых (1) и зараженных патогеном *Botrytis cinerea* (2):

а — наилучшее теоретическое приближение кривых термофлуоресценции; значения параметров для контроля (1): $A_0 = 0,4$, $B_{10} = 0,4$, $B_{20} = 0,1$, $k_1 = 0,4$, $k_2 = 1$, $E_{d24} = 0,094$; для опыта (2): $A_0 = 0,5$, $B_{10} = 0,01$, $B_{20} = 0$, $k_1 = 0,06$, $k_2 = 0,01$, $E_{d24} = 0,108$, значения остальных параметров те же, что в работе [49];

б — экспериментальные кривые термофлуоресценции

теоретических и экспериментальных результатов. Анализ значений параметров, соответствующих кривым термофлуоресценции для зараженных и контрольных растений, позволяет предположить, что в зараженных растениях безызлучательная деактивация состояний с восстановленными хинонами происходит гораздо чаще, чем в контроле, так что значения коэффициентов связи между пиками в контроле много больше, чем для зараженных растений, $(K_1, K_2)_{\text{зараж}} \ll (K_1, K_2)_{\text{контр}}$. Это может быть связано с изменением окислительно-восстановительного потенциала среды вокруг фотосистемы 2 в зараженных растениях. Таким образом, использование данной модели позволяет сделать некоторые выводы о месте воздействия патогена *Botrytis cinerea* на реакционный центр фотосистемы 2.

Теоретические и экспериментальные кривые термофлуоресценции здоровых и зараженных листьев огурца и пшеницы представлены на рис. 2 и 3, соответственно. На основании анализа теоретического приближения экспериментальных кривых можно сделать выводы о заселенности начальных состояний ФС 2. В случае зараженных листьев огурца заселенность состояния $S_4^+DPIQ_A^-$ в шесть раз больше, чем в контроле. Возможно, на начальной стадии болезни патоген стимулирует электронный транспорт. Энергия активации перехода $S_3^+DPIQ_A^- \rightarrow S_2^+DPIQ_A^-$ в кислородвыделяющем комплексе в зараженных растениях возрастает.

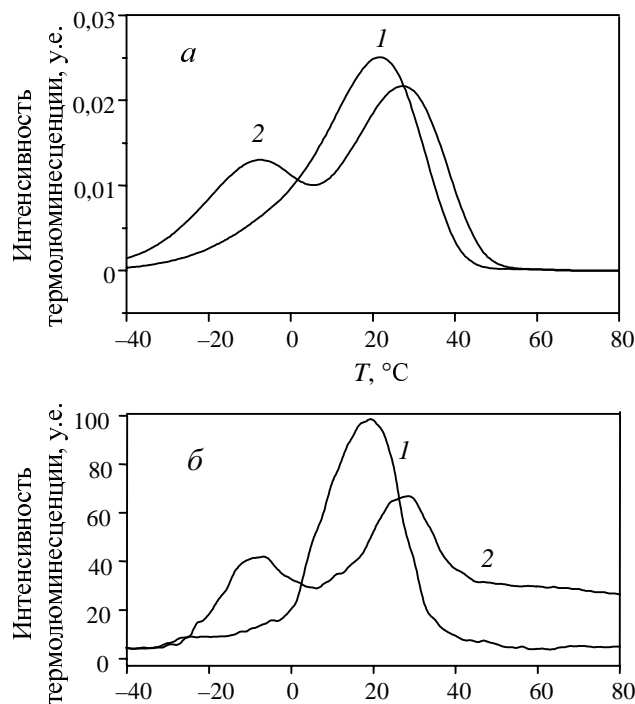


Рис. 2. Теоретическая и экспериментальная кривые термофлуоресценции первых настоящих листьев огурцов здоровых (1) и зараженных патогеном *Botrytis cinerea* (2) через 3 дня после заражения:

а — наилучшее теоретическое приближение кривых термофлуоресценции; значения параметров для контроля (1): $A_0 = 0,1$, $B_{10} = 1$, $B_{20} = 0,01$, $k_1 = 1$, $k_2 = 0,01$, $E_{d23} = 0,11$; для опыта (2): $A_0 = 0,6$, $B_{10} = 1$, $B_{20} = 0,01$, $k_1 = 1$, $k_2 = 0,01$, $E_{d23} = 0,12$;

б — экспериментальные кривые термофлуоресценции

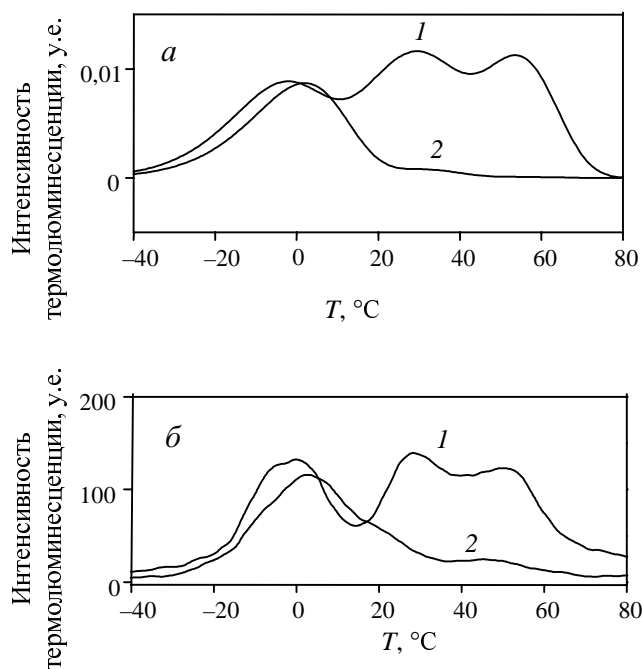


Рис. 3. Теоретическая и экспериментальная кривые термовысвечивания листьев пшеницы сорта Маркиз Sr Tt здоровых (1) и зараженных патогеном *Erysiphe graminis f. tritici* Maqon (2) через 13 дней после заражения:

а — наилучшее теоретическое приближение кривых термовысвечивания; значения параметров для контроля (1): $E_{d22} = 0,115$, $E_{d24} = 0,081$, $E_{d23} = 0,105$, $E_{a32} = 0,03$, $E_{a2} = 0,138$, $A_0 = 0,5$, $B_{10} = 0,2$, $B_{20} = 0,3$, $k_1 = 1$, $k_2 = 1$; для опыта (2): $A_0 = 0,2$, $B_{10} = 0,01$, $B_{20} = 1$, $k_1 = 0,4$, $k_2 = 1$, $E_{a1} = 0,16$, $E_{a2} = 0,14$, $E_{a31} = 0,076$, $E_{a32} = 0,04$, $E_{d1} = 0,14$, $E_{d22} = 0,115$, $E_{d23} = 0,105$, $E_{d24} = 0,088$;

б — экспериментальные кривые термовысвечивания. Люминесценцию регистрировали после освещения образцов одной вспышкой при -30°C

В зараженных растениях пшеницы заселенность состояний $S_4^+DPIQ_A^-$ и $S_3^+DPIQ_AQ_B^{2-}$ уменьшается. Возможно, окислительный потенциал стромы или внутритилакоидного пространства в хлоропластах изменяется таким образом, что реакционный центр в состояниях, отвечающих за пики А и V_1 , отдает электроны во внешнюю среду, а в состояниях, соответствующих пику V_2 , принимают электроны из внешней среды.

Концентрация состояний $S_2^+DPIQ_AQ_B^-$ увеличивается, а концентрация $S_4^+DPIQ_A^-Q_B^{2-}$ уменьшается, что согласуется с уменьшением k_1 — константы связи между пиками А (-10°C) и V_1 (25°C).

В заключение отметим, что наша теоретическая модель может быть использована для анализа экспериментально полученных кривых термовысвечивания, разложения их на отдельные компоненты и для оценки изменений энергий активации отдельных реакций обратного электронного переноса, начальных заселенностей состояний и коэффициентов связи между пиками под действием различных внешних факторов. Включение в модель большого числа состояний реакционных центров фотосистемы 2 с учетом их относительной заселенности в зависимости от условий и способа возбуждения позволяет существенно улучшить разложение кривых термовысвечивания на отдельные компоненты и определение характеристик отдельных пиков.

Авторы благодарны нашим коллегам кандидату физико-математических наук М.К. Солнцеву и аспиранту Ф.А.П. Екобене за предоставленные ими экспериментальные результаты по изучению влияния патогенов на кривые термовысвечивания высших растений.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке программы «Университеты России».

ЛИТЕРАТУРА

1. Arnold W., Sherwood N.E. Proc. Nat. Acad., 1957, v. 13, p. 105.
2. Arnold W., Sherwood N.E. J. Phys. Chem., 1959, v. 63, p. 2.
3. Тумерман Л.А., Завильгельский Б.В., Иванов В.И. Биофизика, 1962, т. 7, с. 21.
4. Красновский А.А., Литвин Ф.Ф. Молекул. биология, 1969, т. 3, с. 282.
5. Arnold W. Science, 1966, v. 154, p. 1046.
6. Arnold W., Azzi R.J. Photochem. Photobiol., 1974, v. 14, p. 233.
7. Jons W.L. Proc. Nat. Acad., 1967, v. 58, p. 75.
8. Arnold W., Azzi R.J., Ibid., 1968, v. 61, p. 29.
9. Литвин Ф.Ф., Звалинский В.М. Биофизика, 1971, т. 16, с. 420.
10. Мейланов И.С., Бендерский В.А., Блюменфельд Л.А. Там же, 1970, т. 15, с. 822.
11. Мейланов И.С., Бендерский В.А., Блюменфельд Л.А. Там же, 1970, т. 15, с. 959.
12. Fleishman D.E. Photochem. Photobiol., 1971, v. 14, p. 65.
13. Fleishman D.E., Clayton R. Ibid., 1966, v. 8, p. 287.
14. Fleishman D.E., Cooke A.J. Ibid., 1971, v. 14, p. 71.
15. Bertsch W.F., Lurie S.D. Ibid., 1971, v. 14, p. 251.
16. Bertsch W.F., West J., Hill R. Biochim. Biophys. Acta, 1969, v. 172, p. 525.
17. Bertsch W.F., West J., Hill R. Photochem. Photobiol., 1971, v. 14, p. 241.
18. Mar T., Govindjee. Biochim. Biophys. Acta, 1971, v. 226, p. 200.
19. Stacy T. W., Mar T., Swenberg E.C., Govindjee. Photochem. Photobiol., 1971, v. 14, p. 197.
20. Robinson G.W. Proc. Nat. Acad., 1963, v. 49, p. 521.
21. Jursinic P., Govindjee. Photochem. Photobiol., 1972, v. 15, p. 331.
22. Литвин Ф.Ф., Шувалов В.А. Докл. АН СССР, 1968, т. 181, с. 733.
23. Литвин Ф.Ф., Шувалов В.А. Молекул. биология, 1968, т. 3, с. 59.
24. Кукушкин А.К. Биофизика, 1968, т. 13, с. 1124.
25. Венедиктов П.С., Маторин Д.Н., Рубин А.Б. Науч. докл. Высшей школы биол. науки, 1969, № 2 с. 46.
26. Венедиктов П.С., Маторин Д.Н., Рубин А.Б. Труды Моск. об-ва испытателей природы, отд. биол., 1972, № 39, с. 90.
27. Рубин А.А., Венедиктов П.С. Физиология растений, 1968, т. 15, с. 34.
28. Рубин А.А., Венедиктов П.С. Биофизика, 1969, т. 14, с. 105.
29. Desai T.S., Sane P.V., Tataka V.G. Photochem. Photobiol., 1975, v. 24, p. 345.
30. Sane P.V., Desai T.S., Tataka V.G. Ibid., 1977, v. 26, p. 33.
31. Sane P.V., Desai T.S., Tataka V.G. Biochim. Biophys. Acta, 1977, v. 462, p. 775.
32. Lurie S., Bertsch W.F. Ibid., 1974, v. 357, p. 420.
33. Lurie S., Bertsch W.F. Ibid., 1974, v. 357, p. 429.
34. Ichikawa T., Inoue J., Shibata K. Ibid., 1975, v. 408, p. 229.
35. Inoue J., Furuta S., Oku T., Shibata K. Biochim. Biophys. Acta, 1976, v. 449, p. 357.
36. Inoue J. FEBS Lett., 1976, v. 72, p. 279.
37. Inoue J., Jamashita T., Kobayashi J., Shibata K. FEBS Lett., 1977, v. 82, p. 303.

38. *Inoue J., Jamashita T., Kobayashi J., Shibata K.* Biochim. Biophys. Acta, 1976, v. 440, p. 772.
39. *Inoue J., Shibata K.* FEBS Lett., 1978, v. 85, p. 193.
40. *Inoue J.* In: Biophysical Techniques in Photosynthesis Eds. J. Amesz, A.J. Hoff. Kluwer Acad. Publ., 1996, p. 93–107.
41. *Randall J.F., Wilkins J.H.F.* Proc. Roy. Soc. London, 1945, v. 184, p. 366.
42. *De Vault D., Govindjee, Arnold W.* Proc. Natl. Acad. Sci., 1983, v. 86, p. 983.
43. *Харкянен В.Н., Христофоров Л.Н.* Препринт ИТФ-84-104Р Института теоретической физики Академии наук Украинской ССР, 1984.
44. *Кукушкин А.К., Новикова Л.В.* Вероятностная модель термолюминесценции растений. Препринт Физического факультета МГУ 9/1989, 1989.
45. *Клеваник А.В.* Биол. мембр., 1991, т. 8, № 8, с. 813.
46. *Клеваник А.В.* Там же, 1995, т. 29, № 3, с. 653.
47. *Кукушкин А.К., Новикова Л.В.* Биофизика, 1991, т. 36, № 4, с. 640.
48. *Кузнецова С.А., Кукушкин А.К., Новикова Л.В.* Там же, 2000, т. 45, с. 260–268.
49. *Кузнецова С.А., Кукушкин А.К., Новикова Л.В.* Там же, 2000, т. 45, с. 469–483.