

МЕТОДИКА

ПРИБОР ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПЕРЕХОДНЫХ ЯВЛЕНИЙ ФОТОСИНТЕЗА ПРИ ПОМОЩИ РАДИОИЗОТОПА УГЛЕРОДА C^{14}

В. Е. СЕМЕНЕНКО

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Академии наук СССР, Москва

Сопряженно действующие биофизико-химические процессы, обеспечивающие ассимиляцию лучистой энергии света в фотосинтезе, находятся при внезапном освещении объекта в течение некоторого периода времени в состоянии разветвления — «сыгрывания» — отдельных звеньев, пока не наступает устойчивое согласованное неравновесие всех систем, направляющее процесс в целом по строго определенному руслу. Это состояние процесса фотосинтеза получило название «индукционного периода фотосинтеза».

В дальнейшем, когда процесс находится в *in steady state*, явления, характерные для индукционного периода фотосинтеза, оказываются скрытыми общим ходом интенсивного восстановления углекислоты. В это время отчетливо наблюдаются «концевые эффекты» — поглощение CO_2 , выделение кислорода, накопление продуктов восстановления углерода, но промежуточные механизмы, обеспечивающие этот процесс, оказываются скрытыми. Поэтому изучение переходных явлений фотосинтеза, наблюдающихся в первый момент после освещения объекта и при его затемнении, имеют большое значение для познания внутреннего механизма фотосинтеза. «Накопленные таким путем сведения, — приходит к заключению Е. Рабинович, — представляют собой фундаментальный вклад в общее дело создания точной науки о фотосинтезе и биохимии в целом» [1].

При изучении индукционных явлений установлено, что в первую минуту после начала освещения наблюдается быстрое поглощение углекислоты (так называемый «глоток» CO_2) и в это же, или близкое к нему, время происходит «выброс» кислорода, резкий переход неорганического фосфора в органический, уменьшение флуоресценции и поглощения при 515 $m\mu$.

В дальнейшем кривая поглощения CO_2 идет вниз, и аналогичными кривыми описываются кинетика выделения O_2 , превращения фосфора, флуоресценция, хемилуминисценция и т. д. [1—3]. Таким образом, принципиальный ход процессов установлен. Однако еще трудно найти связь между многими отдельными наблюдениями и тем более объяснить их на основании какого-нибудь простого механизма. В значительной мере это объясняется тем, что используемые для изучения индукционных явлений методы часто не позволяют интерпретировать получаемые результаты. В частности, это имеет место при рассмотрении данных относительно кинетики поглощения CO_2 в индукционном периоде фотосинтеза, поскольку такие измерения проводятся в аппаратах, в которых осуществляется ток воздуха через камеру с объектом, и анализ содержания CO_2 осуществляется по дифференциальной схеме [4—7]. Поэтому, например, нельзя точно сказать, чем определяется специфическое понижение кривой поглощения CO_2 после первоначального «глотка». Происходит ли через некоторое время после начала освещения приостановка поглощения CO_2 (например, из-за исчерпания имевшегося в темноте запаса акцептора CO_2) или в данном случае имеет место обратное выделение CO_2 , вызванное,

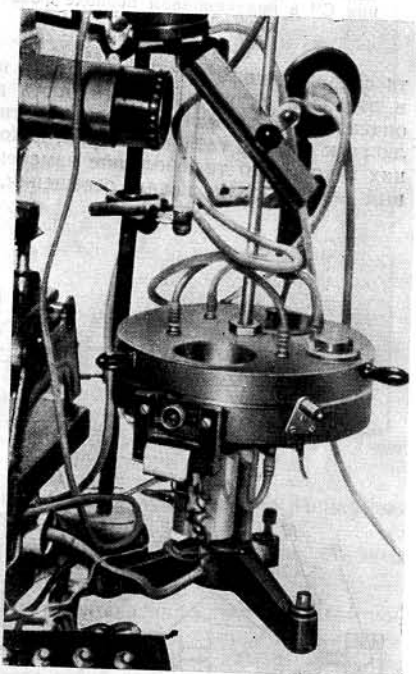


Рис. 1. Прибор для изучения переходных явлений фотосинтеза при помощи радиоизотопа углерода C^{14}

допустим, включением в цепь реакций окислительных процессов. Решение одного этого вопроса представляется важным, особенно в последнее время, когда Варбург выдвинул свою гипотезу дисмутации энергии в процессе фотосинтеза [8] и с новой силой возобновилась дискуссия о квантовых расходах фотосинтеза и его химизме [1, 9, 10].

Мы попытались изучить с помощью радиоизотопа углерода C^{14} некоторые из неясных вопросов, которые бы связали между собой уже установленные эффекты или

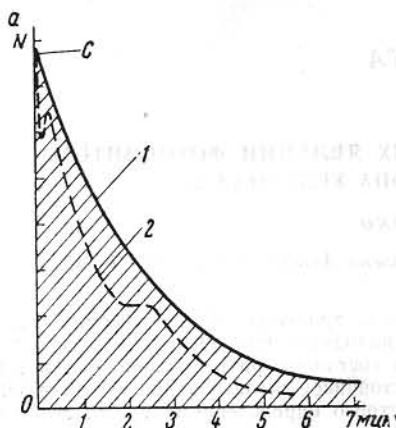


Рис. 2. Падение радиоактивности в замкнутой камере при экспонировании в ней зеленого листа

1 — регистрируемый ход падения радиоактивности в камере; 2 — зона, недосягаемая для измерения; возможный действительный ход кинетики поглощения C^{14} в индукционном периоде фотосинтеза; C — свет

та с применением C^{14} неоднократно использовались для изучения фотосинтеза [11—13], и показана их полная пригодность для этих целей. Однако, как показали расчеты в описанных в литературе камерах, отношение активной фотосинтезирующей поверхности листа к объему газа в камерах, к концентрации и удельной активности углекислоты в них таковы, что те небольшие изменения радиоактивности, которые наблюдаются в первый момент после начала освещения, оказываются скрытыми в зоне, недосягаемой для

позволили бы однозначно их интерпретировать с тем, чтобы выяснить, какие механизмы скрываются за специфическим ходом кривых индукционного периода фотосинтеза.

При помощи специально для этого построенного прибора (рис. 1) удалось показать [3], что во время индукционного периода фотосинтеза, после быстрого начального поглощения углекислоты, следует выбрасывание части CO_2 , поглощенной в предыдущий момент, а не приостановка ее поглощения, как это принято считать. Изучены переходные явления фотосинтеза, которые наблюдаются при переходе от света к темноте.

Одной из основных частей установки является специальная камера для экспонирования объекта в $C^{14}O_2$.

При изучении вопроса с методической стороны мы остановились на использовании замкнутой камеры для экспонирования объекта потому, что в этом случае все регистрируемые изменения содержания CO_2 (в отличие от дифференциальных газоанализаторов с током газа в них) могли определяться только деятельностью помещаемого в камеру зеленого листа. Все изменения содержания CO_2 могли непрерывно учитываться и регистрироваться на самописце благодаря использованию в качестве индикатора радиоизотопа углерода C^{14} . Замкнутые камеры для экспонирования объек-

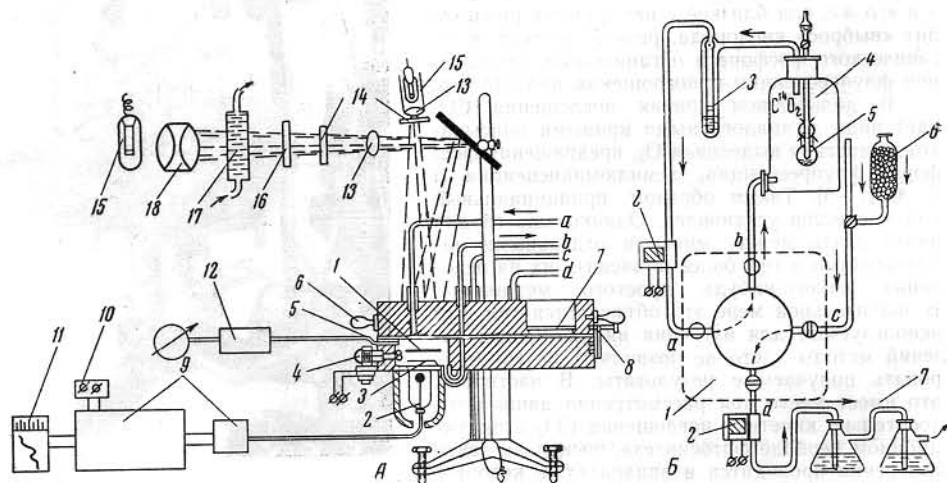


Рис. 3. Принципиальная схема прибора

А — камера для экспонирования: 1 — лист; 2 — торцовый счетчик; 3 — экран; 4 — вентилятор; 5 — термистор; 6 — рукоятки; 7 — застекленное окно; 8 — стопор; 9 — пересчетная схема; 10 — механический счетчик импульсов; 11 — самописец; 12 — блок контроля температуры; 13 — объективы; 14 — нейтральные светофильтры; 15 — осветители; 16 — цветной светофильтр; 17 — тепловой фильтр. Б — Система тока газа: 1 — камера для экспонирования; 2 — диафрагменные насосы; 3 — реометр; 4 — емкость с газообразной $C^{14}O_2$; 5 — ампула с радиоактивной содой; 6 — поглотитель углекислоты; 7 — поглотители $C^{14}O_2$; a, b, c, d — отводные трубки

измерения общим высоким фоном радиоактивности в камере в начале экспозиции (рис. 2). Чтобы эти изменения в содержании C^{14} (если они существуют) в начале освещения листа можно было учесть, необходимо, чтобы размеры камеры были такими, при которых отношение количества углекислоты, поглощаемой за 1 мин. данной площадью листа, при данной интенсивности его фотосинтеза, к количеству CO_2 в камере было равно 0,1—1. Эти исходные данные были положены в основу при конструировании камеры и всей установки. Собранный установка состоит из специальной камеры для

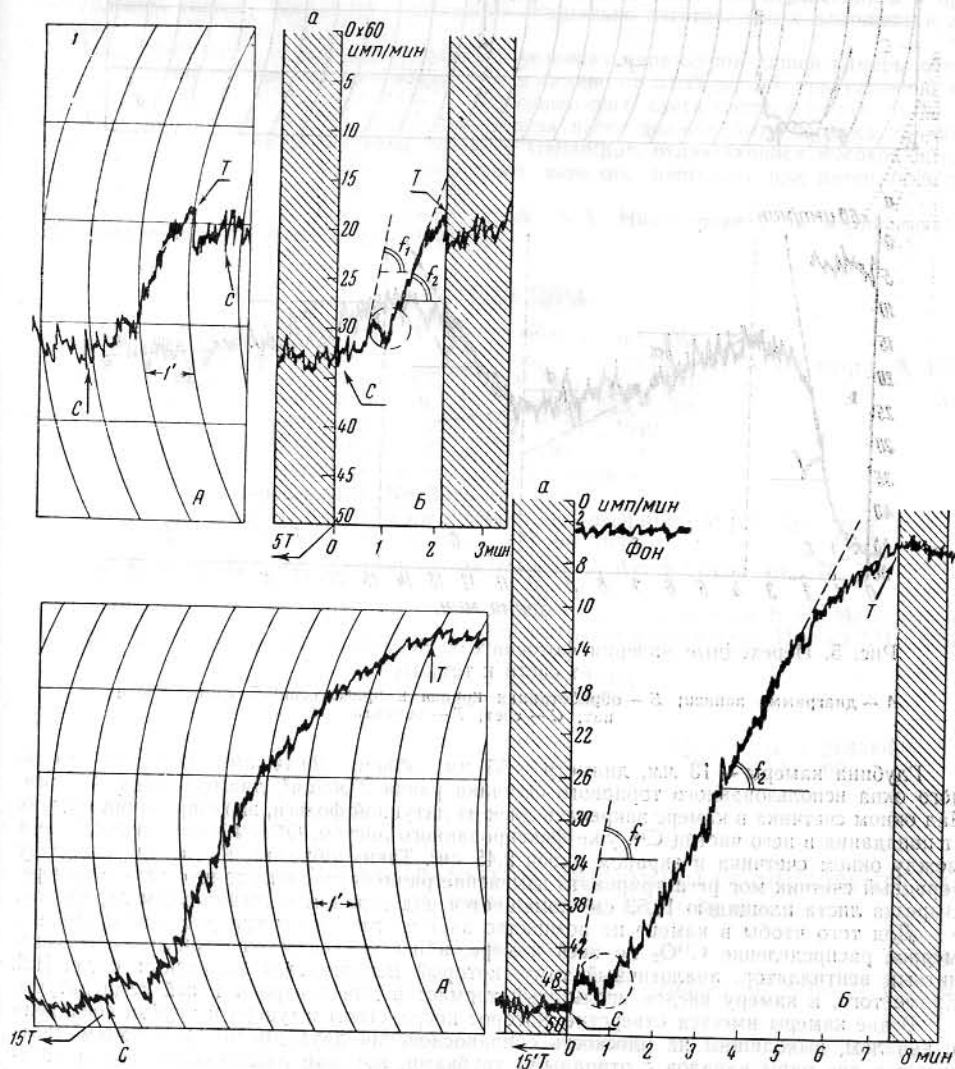


Рис. 4. Кинетика поглощения $C^{14}O_2$ в индукционном периоде фотосинтеза *Helianthus annuus*

А — диаграммы записей; Б — обработанные кривые в прямоугольной системе координат; С — свет; Т — темнота

экспонирования объекта, осветительных систем, системы заполнения камеры $C^{14}O_2$ и поглощения отработавшей активности, а также электронного блока с самопишущим прибором на выходе для непрерывной записи изменений активности в камере (рис. 3).

Камера для экспонирования объекта представляет собой два металлических (сталь и мелкозернистый чугун) диска, диаметром 190 мм, толщиной 25 мм, которые наложены друг на друга и так притерты друг к другу, что при вращательном смещении верхнего диска относительно нижнего сохраняется полная герметичность между плоскостями их соприкосновения. Нижний диск закреплен на штативе неподвижно. Верхний диск может вращаться вокруг своей оси. Собственно камера для помещения листа находится в нижнем диске и представляет собой эксцентрично расположенное отверстие, в которое снизу ввернута обойма торцового счетчика Гейгера-Мюллера таким образом, что торец ее и окошко счетчика являются собственно дном камеры.

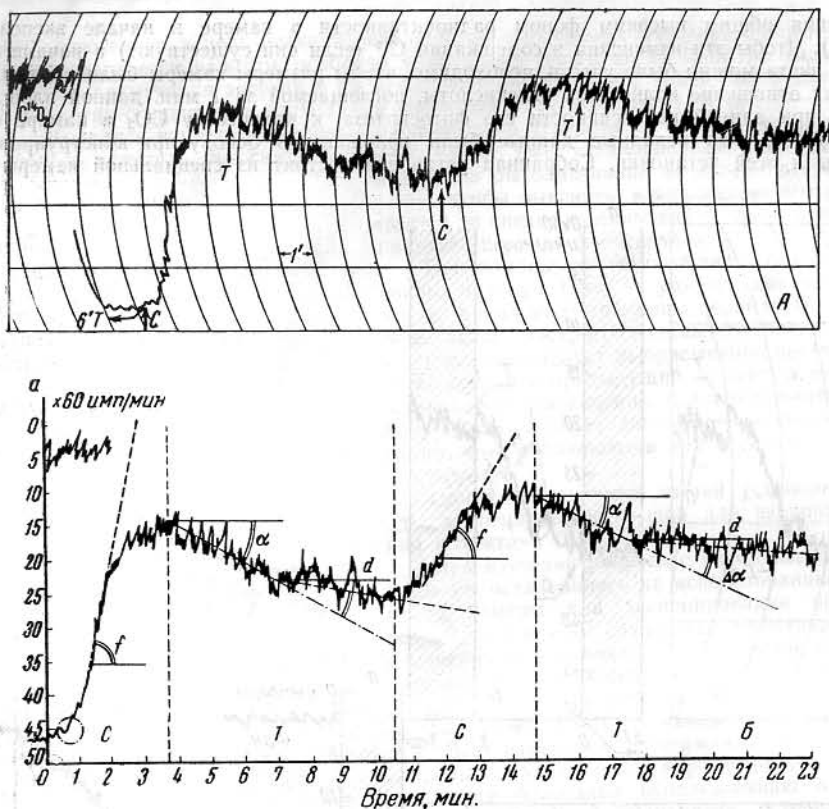


Рис. 5. Переходные явления фотосинтеза *Helianthus annuus* при переходе от света к темноте

А — диаграмма записи; Б — обработанная кривая в прямоугольной системе координат; С — свет; Т — темнота

Глубина камеры — 13 мм, диаметр — 55 мм, объем — 29,44 см³. Толщина слюдяного окна использованного торцового счетчика равна 2 мг/см², диаметр окна — 25 мм. Над окном счетчика в камере закреплен диск из латунной фольги, экранирующий счетчик от попадания в него частиц С¹⁴, уже фиксированного листом. Объем эффективного счета между окном счетчика и экраном равен 2,45 см³. Таким образом, введенный в камеру торцовый счетчик мог регистрировать изменение радиоактивности только газа в камере. Вырезка листа площадью 19,53 см² помещается над экраном в специальном держателе.

Для того чтобы в камере не возникало застоев газа и быстро достигалось равномерное распределение С¹⁴О₂ по всей камере, в нее введен миниатюрный электромагнитный вентилятор, аналогичный тому, который используется Заленским и др. [12]. Кроме того, в камеру введен игольчатый термистор для контроля в ней температуры.

В дне камеры имеется отверстие, которое посредством штуцера и трубки соединено с каналом, выходящим на плоскость соприкосновения двух дисков. В верхнем диске имеется две пары каналов с отводными трубками, которые расположены таким образом, что в определенных, фиксируемых при помощи стопора, положениях верхнего диска они совмещаются с камерой, с листом и каналом в нижнем диске (как показано на рис. 3). В этих положениях верхнего диска может проходить или заполнение камеры С¹⁴О₂ посредством продувки специально приготовленной смесью газов с С¹⁴О₂, или промывка камеры и поглощение С¹⁴О₂ щелочью. Кроме того, в верхнем диске имеются люк для помещения в камеру листа и застекленное окно. Таким образом, все операции с камерой — помещение в нее листа, заполнение С¹⁴О₂, освещение, затемнение объекта, поглощение С¹⁴О₂ — осуществляются посредством вращения и установки в определенных положениях верхнего диска.

Отводные трубки *a* и *b* (рис. 3) верхнего диска подключаются к замкнутому циклу, в котором ток газа при заполнении камеры С¹⁴О₂ создается при помощи герметичного диафрагменного электромагнитного насоса. С¹⁴О₂ определенной удельной активности генерируется в склянке (объем 2 л), включенной в систему. Две других отводных трубки (*c* и *d*) соединены с другим диафрагменным насосом и системой поглощения С¹⁴О₂. Осветительные системы аналогичны тем, которые использовались нами ранее [7].

Регистрация и запись изменений радиоактивности в камере осуществляется с помощью пересчетной схемы с самопишущим прибором на выходе Н 370-А на 1500 мА. Инерционность всей системы равна 25—35 сек.

Вырезка листа помещалась в камеру, которая заполнялась газом с определенным содержанием $C^{12}O_2$ и $C^{14}O_2$, и в зависимости от изучаемого вопроса объект освещался, затемнялся или подвергался другим воздействиям. Примеры записей кинетики поглощения $C^{14}O_2$ в индукционном периоде фотосинтеза и переходных явлений фотосинтеза, которые наблюдаются при переходе от света к темноте, приведены на рис. 4 и 5, где представлены подлинные диаграммы записей и обработка получаемых кривых. Используемый самопишущий прибор осуществляет запись в искривленной системе координат. Поэтому для количественной обработки получаемых данных они переносятся в прямоугольную систему координат с помощью специально изготовленных планшета и линейки.

Индукционные и переходные явления в условиях параметров нашей камеры отчетливо наблюдаются при концентрациях CO_2 в камере от 0,035 до 1% при удельной активности от 5 до 0,7 $\mu C/mg$ CO_2 и интенсивностях света соответственно от 20 до $50 \cdot 10^3$ лк. При этом интенсивность фотосинтеза листа должна быть порядка 25—30 и более $mg/dm^2 \cdot час$. Таким объектом оказался *Helianthus*, отличающийся высокой интенсивностью фотосинтеза, световое насыщение которого наступает при интенсивностях света порядка 400×10^3 $эрг/cm^2 \cdot сек$ [14].

Приношу глубокую благодарность проф. А. А. Ничипоровичу за неоднократное обсуждение вопроса и руководство работой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рабинович Е. Фотосинтез, 3, Изд-во иностр. лит., М., 1959.
2. Wassink E. K. and Spruit C. J. P. Congrès International de Botanique, 3, 1954.
3. Семеновко В. Е. Докл. АН СССР, 134, № 1, 207, 1960.
4. Aufdemgarten H. Planta, 29, 643, 1939; 30, 343, 1939.
5. Veen R. Van der. Physiol. Plantarum, 2, 3, 217, 1949.
6. Veylby K. Physiol. plantarum, 11, I, 158, 1958.
7. Семеновко В. Е. Физиол. растений, 5, 561, 1958.
8. Warburg O. Science, 128, No 3315, 68, 1958.
9. Gaffron H. und Rosenberg J. Naturwissenschaften, H. 12, 354, 1955.
10. Frank J. Arch. Biochem., and Biophys., 45, 190, 1953.
11. Weige J. W. Warrington and Calvin H. J. Amer. Chem. Soc., 75, N 11, 5058, 1951.
12. Заленский О. В., Семихатова О. А., Вознесенский В. Л. Методы применения радиоактивного углерода C^{14} для изучения фотосинтеза. Изд-во АН СССР, 1955.
13. Рагинский В. В. Физиол. растений, 2, 182, 1955.
14. Семеновко В. Е. Физиол. растений, 4, 476, 1957.

Поступила в редакцию
23.V.1960

AN APPARATUS FOR STUDYING TRANSITION PHENOMENA OF PHOTOSYNTHESIS WITH AID OF THE RADIOACTIVE ISOTOPE C^{14}

V. E. SEMENENKO

K. A. Timiriazev Institute of Plant Physiology, USSR Academy of Sciences, Moscow

An apparatus for studying the mechanism of transition processes in photosynthesis induced by sudden illumination or darkening of green leaves is described.

The apparatus in essence consists of an air-tight leaf chamber which contains an end-window counter, small fan and temperature sensitive element. The chamber can be illuminated. It is connected to a system of diaphragm pumps and shutters which permit one to change rapidly the gas in the chamber. The chamber volume, leaf area and CO_2 concentration are chosen in such a way that it is possible to study the induction effects by measuring the C^{14} activity. Variations in the radioactivity in the chamber during photosynthesis are recorded automatically.

By aid of the apparatus it has been demonstrated that after a rapid CO_2 «gulp» observed directly after the beginning of illumination, part of the CO_2 absorbed during the «gulp» is evolved, the rate of this gush being about 60% of the absorption rate. Transition phenomena accompanying the change from light to darkness were investigated.