

KLOROFILL-a EMISSZIÓS DIPÓLJAINAK ORIENTÁCIÓJA
FOTOSZINTETIKUS MEMBRÁNOKBAN

EGYETEMI DOKTORI DISSZERTÁCIÓ

KISS JÓZSEF GÉZA

Készült az MTA Szegedi Biológiai Központ
Növényélettani Intézetében

S Z E G E D

1 9 7 9



A dolgozatban használt rövidítések jegyzéke

ATP	adenozin-trifoszfát
F 695	fluoreszcencia sáv a névleges csucshelyzet- tel /nm-ben/
FD	fluoreszcencia polarizáció különbség : I -I
FP	fluoreszcencia polarizáció hányados : I /I
FSZ I.	I. fotoszisztéma
FSZ II.	II. fotoszisztéma
Kl a 670	abszorpciós sáv a névleges csucshelyzettel /nm-ben/
kl-a	klorofill-a
kl-b	klorofill-b
kar	karotinoidok
LD	lineáris dikroizmus: A - A
NADPH ₂	redukált nikotin-amid-adenin-dinukleotik- foszfát
P-680	II. fotoszisztéma reakciócentruma
P-700	I. fotoszisztéma reakciócentruma



T A R T A L O M J E G Y Z É K

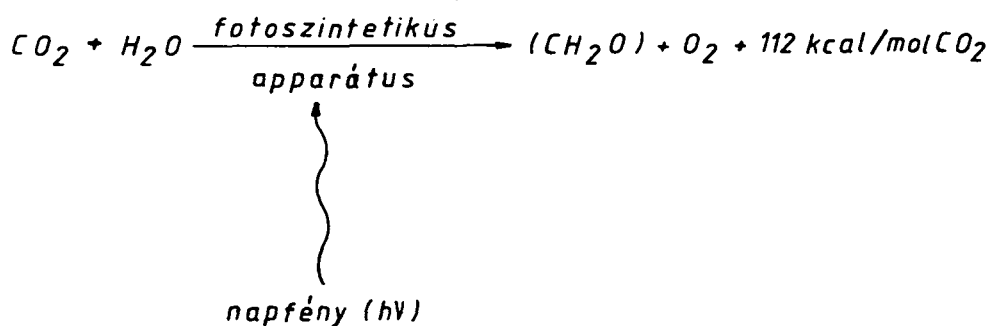
	oldal
1. BEVEZETÉS	1.
1.1. A fotoszintézisről általában	1.
1.2. A gerjesztési energia vándorlása	4.
1.3. A pigmentek orientációja	10.
1.4. Célkitűzés	14.
2. ANYAG ÉS MÓDSZER	16.
2.1. A mérendő anyag előkészítése	16.
2.2. A pigmenttartalom meghatározása	16.
2.3. Az elektronmikroszkópos preparátumok készítése	17.
2.4. Orientáció mágneses térrel	18.
2.5. Az orientálódás mértékének meghatározása	19.
2.6. Orientáció fésüléssel	20.
2.7. A mélyhőmérsékletű polarizált fluoreszcen- cia mérése	20.
2.8. A polarizált fluoreszcencia mérése szoba- hőmérsékleten	23.
3. EREDMÉNYEK	25.
3.1. A fluoreszcencia polarizációs hányados és különbségi spektrumok	25.
3.2. Elméleti megfontolások az "ideális" sík membrán esetére	28.
3.3. Elméleti megfontolások az un. "reális" membránok esetére	31.

3.4. A mágneses orientáció mértékének meghatározása	41.
3.5. A "szféricitás" paraméterének meghatározása	46.
3.6. Az FP koncentráció függése	47.
3.7. A glicerín hatása	49.
3.8. Az FP értékek korrekciójának elmélete a reális membránstruktúra és a nem tökéletes orientáció figyelembevételével	51.
3.9. A különböző emissziós dipólokhoz tartozó FP értékek becslése a fluoreszcencia sávok különválasztása segítségével	56.
4. MEGVITATÁS	62.
5. ÖSSZEFOGLALÁS	66.
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	67.
IRODALOMJEGYZÉK	68.

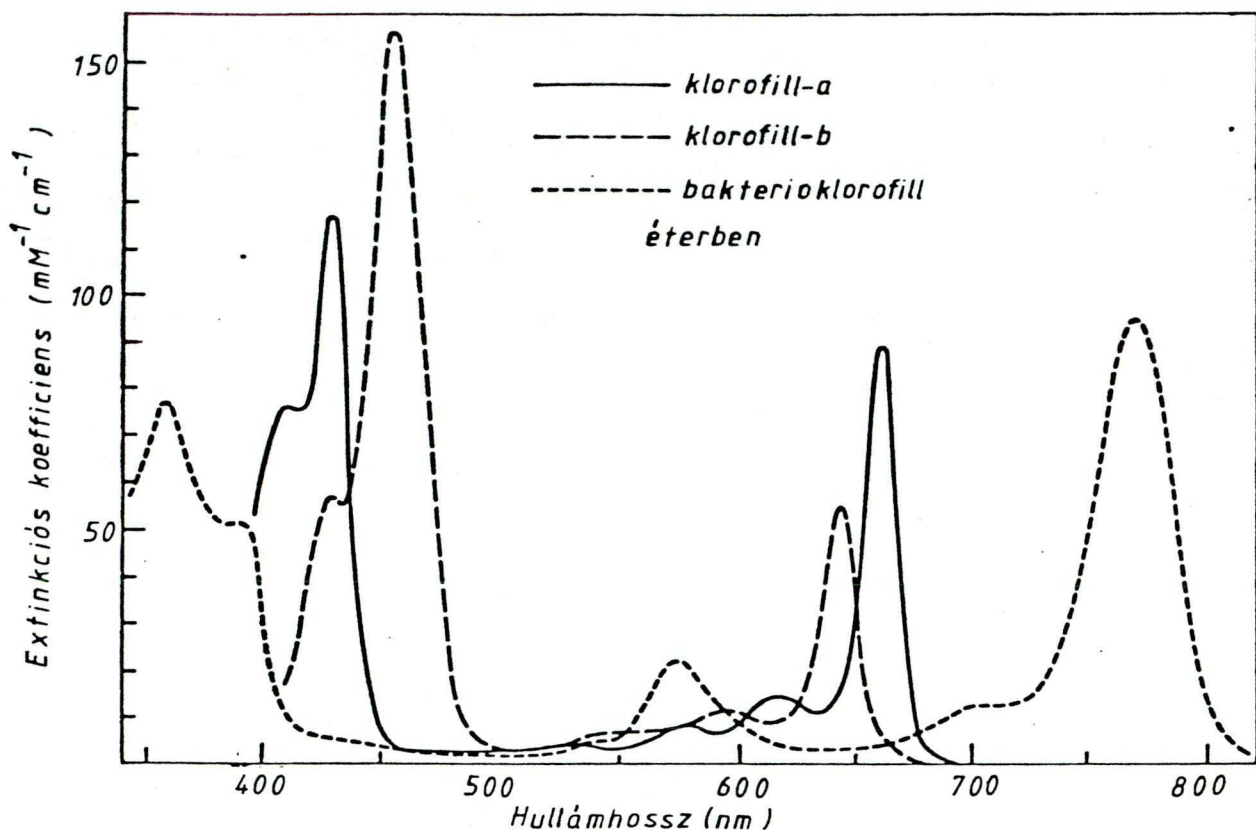
1. B E V E Z E T É S

1.1. A fotoszintézisről általában

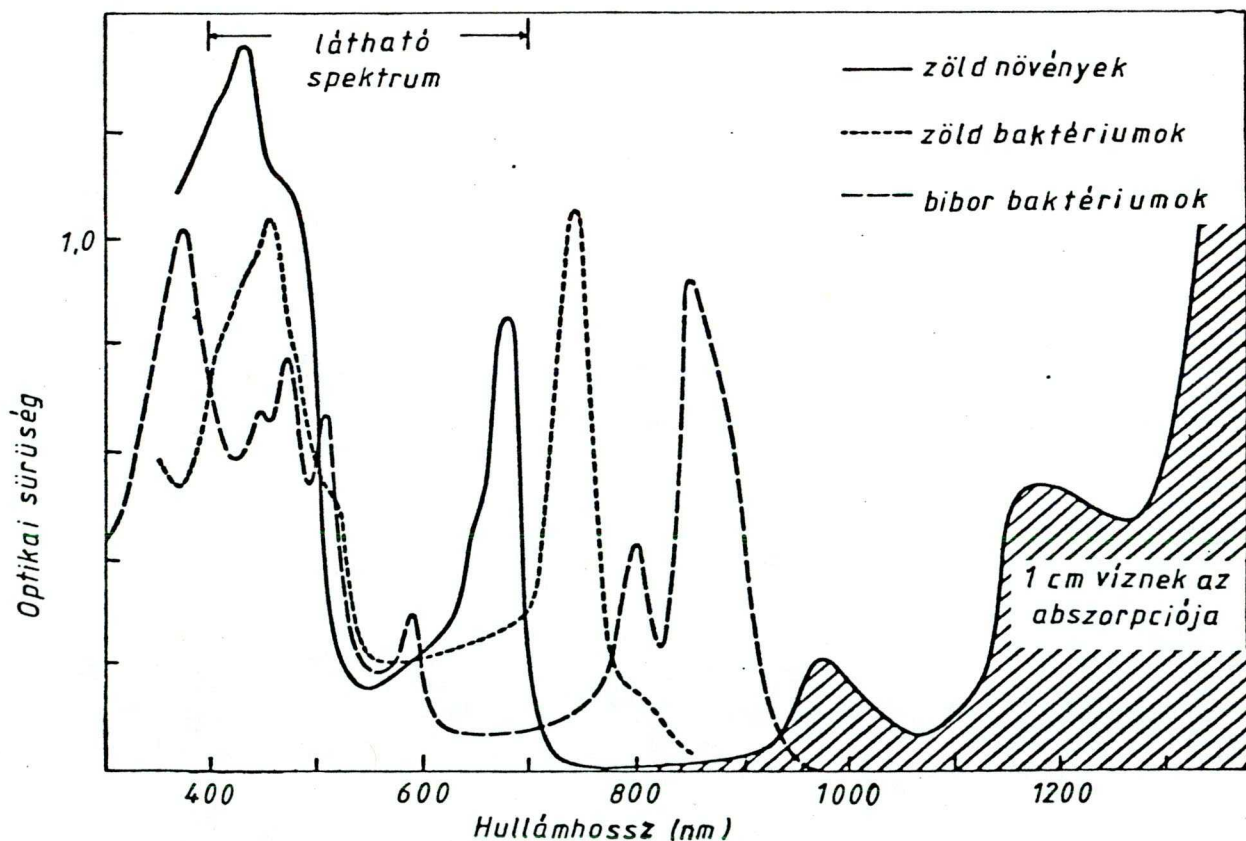
A fotoszintézis a bioszintetikus reakcióláncnak azon típusa, amelyben a szintézishez szükséges energiát a fotokémiai reakciókban stabilizált fényenergia biztosítja. A fotoszintézisnek a szerves eredetű energiahordozók létrehozásán túl az ad rendkívüli jelentőséget, hogy az élővilág számára biztosítja az élethez szükséges szerves anyagokat és az oxigént. A magasabbrendű növényeknél és algáknál az általános reakcióegyenlet a következő /1,2/:



A szerves anyag és az oxigén termelése a növényi sejtek zöld szintestjeiben a kloroplasztiszokban történik. A fotoszintetikus folyamatokhoz szükséges energiát a sztróma és gránum tilakoidokba beágyazott festékmolekulák által elnyelt fényenergia szolgáltatja /lásd 1. és 2. ábrákat/.

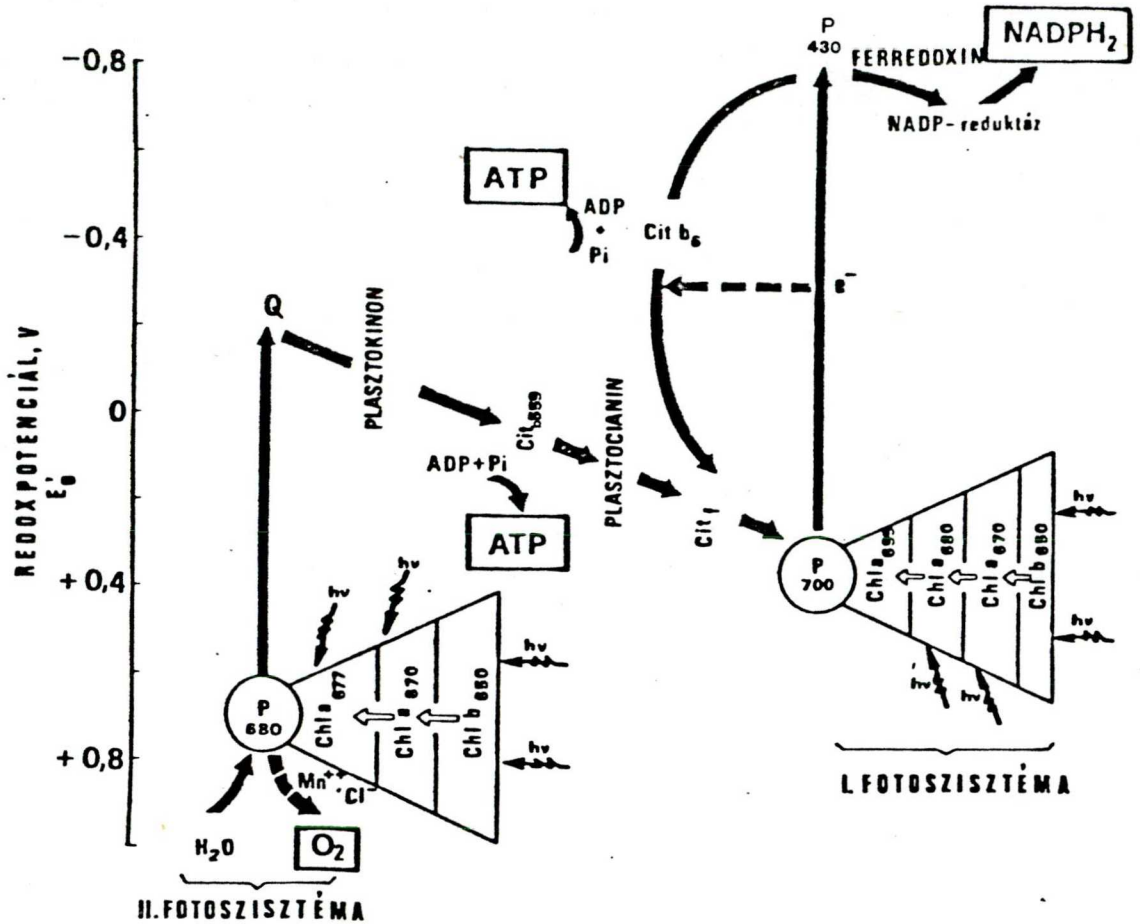


1. ábra. A három legfontosabb fotoszintetikus pigment abszorpciós szinképe éterben. Clayton nyomán / 3 /.



2. ábra. Három különböző típusú fotoszintetizáló organizmus in vivo és az 1 cm-es vízréteg abszorpciós szinképe. Clayton nyomán /3/.

A festékmolekulák a membránokban ún. fotoszintetikus egységeket alkotnak, amelyek mintegy 300 kDa-ból és járulékos pigmentmolekulákból állnak /4,5/. Minden egyes fotoszintetikus egységhez egy ún. reakciócentrum tartozik, a többi pigmentmolekula pedig a reakciócentrumok antennarendszerét alkotja. Az antennarendszerben elnyelt fényenergia energiaátadási folyamatok révén jut a reakció centrumokba /6-8/. A gerjesztett reakciócentrumokban fotokémiai reakció játszódik le, amely során elsődleges töltésszétválasztódás jön létre /9-10/. Ezen reakciót redox folyamatok követik. Az ún. elektronszállító lánc mentén /11-12/ és a kialakult protongradiens energiáját felhasználva /13-14/ képződnek azok a magas energiatartalmú vegyületek /NADPH₂ ill. ATP/, amelyek a széndioxid szerves anyaggá való redukciójának energia szükségletét biztosítják. A termelt oxigén a víz fotolíziséből származik /15-17/. A fotoszintézis elsődleges folyamatait az ún. "Z-séma" szemlélteti /lásd 3. ábrát/ /12,18/. A séma alapján jól látható, hogy a két fotokémiai rendszer jól egybehangolt működése biztosítja az O₂, az ATP és a NADPH₂ képződését, és ezen két utóbbi molekula segítségével a széndioxid redukcióját /19,20/.

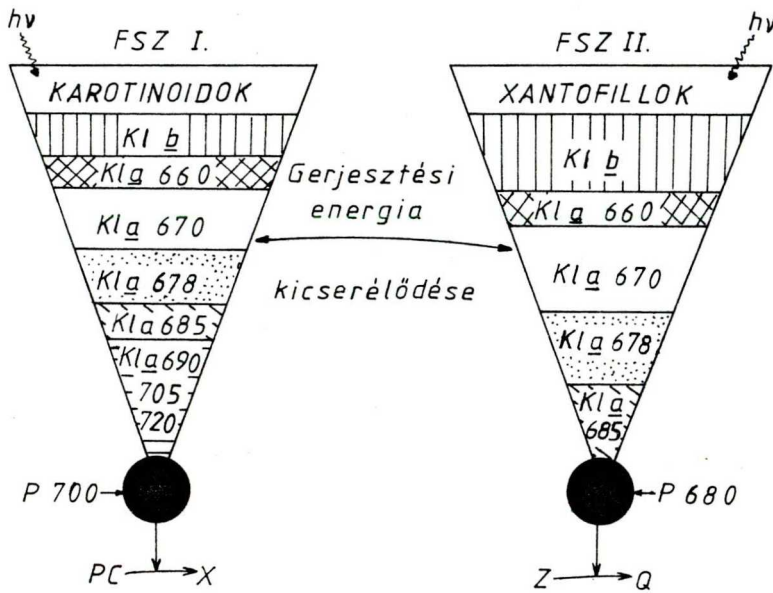


3. ábra. A zöld növények fotoszintézisének két fényreakciója és az elektron-transzport-rendszer, az un. "Z-séma".
Farkas Gábor után /21/.

1.2. A gerjesztési energia vándorlása

A fotoszintézis hatásfokát döntően meghatározó tényező a reakciócentrumok energiával való ellátottsága /22-25/. Elméleti megfontolások alapján Förster - féle induktív rezonanciás energia átadást felté-

telezve /26-28/ kimutatták, hogy az elnyelt fényenergia továbbításának hatásfoka jobb, ha az antennarendszer pigmentösszetétel és molekuláris elrendeződés



4. ábra. A két fotoszisztéma pigmentrendszeré Govindjee alapján /33/.

szempontjából heterogén /29-32/. A különböző klorofillformák létezését modellrendszerek /34-39/ és kloroplaszt-szuszenziók abszorpciós /40-45/, emissziós /44-50/, infravörös /51-53/ és Raman /54,55/ spektrumainak vizsgálatai alapján kísérletileg is bebizonyították, bár a formák száma, természetük és fiziológiai szerepük még ma is vitatott. A két fotoszisztéma pigmentrendszerét a 4. ábrán láthatjuk.

A két fotoszisztéma antennája pigmentösszetételében is különbözik. A leglényegesebb különbség az, hogy az I fotoszisztémában 690 nm-nél hosszabb hullámhosszú fény is hasznosul /19,56/, klorofill-b pedig elsősorban a II fotoszisztémához tartozik /20/.

A különböző klorofillformák közötti energiaátadás hatékonysága erősen függ ezen formák dipóljainak egymáshoz viszonyított orientációjától /3, 57-59/. Förster - féle induktív rezonanciás energiaátadással számolva /27,60/ az energiaátadás gyakorisága /az 1 sec alatti átadási események száma/:

$$n_t = \frac{9 / \ln 10 / c^4 k^2}{128 \pi^5 n^4 N' \tau_e R^6} \int_0^{\infty} f_n / \nu / \epsilon / \nu / \frac{d\nu}{\nu^4} \quad i.$$

ahol: τ_e - a donor fluoreszcenciájának csillapódási ideje az akceptor távollétében

$$N' - 6,02 \cdot 10^{20}$$

$$c - 3 \cdot 10^{10} \text{ cm sec}^{-1}$$

n - a közeg törésmutatója

R - az oszcillátorok távolsága

k - az oszcillátorok kölcsönös orientációjától függő un. orientációs faktor

ν - a frekvencia sec^{-1}

$\epsilon / \nu /$ - az abszorpciós szinkép $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
 $f_n / \nu /$ - a normált fluoreszcencia szinkép, a
normálási feltétel: $\int_0^{\infty} f_0 / \nu / d\nu = 1$

Vegyük most ezeket sorra:

τ_e a molekula-vagy komplextípusra jellemző állandó.
 N' és c adott állandók.

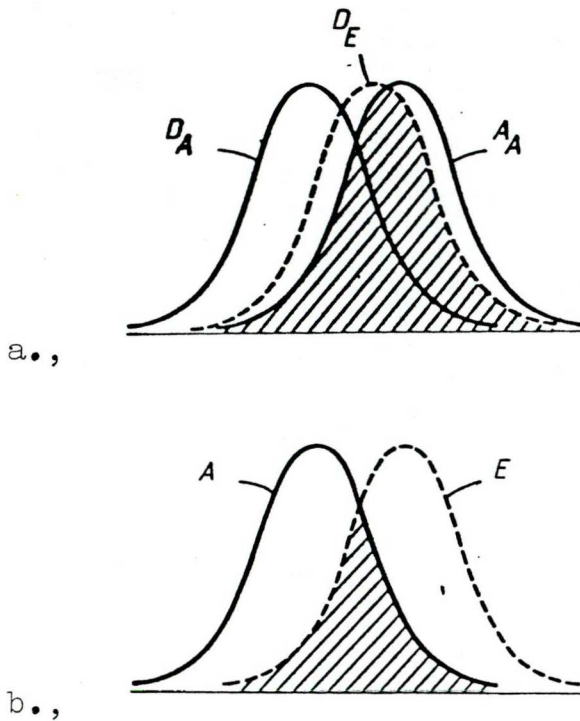
n a közeg által adott mennyiség.

R a koncentráció által adott mennyiség.

Az i. - ben szereplő integrál az un. átfedési integrál értékét a donor fluoreszcencia és az akceptor abszorpciós spektruma közötti átfedés mértéke szabja meg. Az 5. ábrán szemléltetjük a donor fluoreszcencia sávja és az akceptor abszorpciós sávja közötti átfedést heterogén /a. ábra/ és homogén /b. ábra/ rendszer esetében. Az 5. ábrán az integrál értékét az 1 - re normált emissziós és abszorpciós sávok /heterogén esetben D_E és A_A , homogén esetben A és E / által közösen burkolt terület mértéke adja /bevonalkázott terület/. Az ábrán jól látható, hogy az átfedés mértéke heterogén rendszer esetén jóval nagyobb lehet mint a homogén rendszerénél. Az i.-ben szereplő integrál értékére fennáll a következő:

$$0 \leq \int_0^{\infty} \dots \leq 1 \quad \text{ii.}$$





5. ábra. Az átfedési integrál szemléltetése / bevonalkázott terület / a., heterogén és b., homogén rendszer esetében.

a., D_A és D_E a donor abszorpciós és emissziós sávját, az A_A pedig az akceptor abszorpciós sávját jelöli.

b., A és E ugyanannak az anyagnak az abszorpciós és emissziós sávját jelöli.

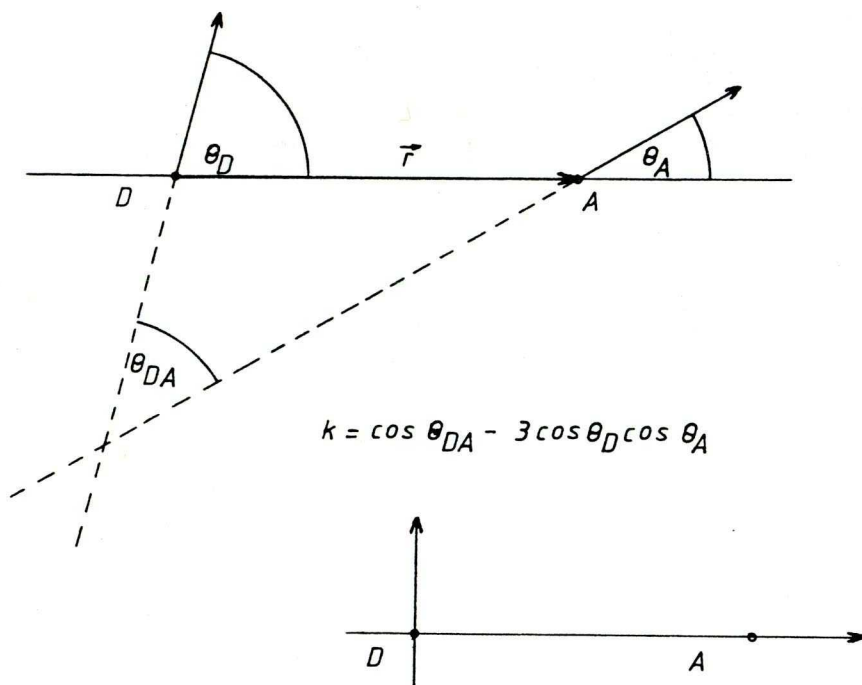
k az un. orientációs faktor, amely az oszcillátorok kölcsönös orientációjától függ / lásd 6. ábra / :

$$k = \cos \Theta_{DA} - 3 \cos \Theta_D \cos \Theta_A \quad \text{iii.}$$

értéke : $0 \leq k^2 \leq 4$

rendezetlen esetre :

$$k^2 = 2 / 3$$



ha $\theta_{DA} = \theta_D = 90^\circ$ akkor $k = 0$

6. ábra. Az oszcillátorok kölcsönös orientációjának szemléltetése. A θ_D és θ_A az egyes oszcillátoroknak a két oszcillátort összekötő egyenessel bezárt szöge, θ_{DA} pedig a két oszcillátor egymáshoz viszonyított szöge.

Az orientációs faktornak, mint az az i. és iii.-ből is látszott, rendkívül fontos szabályozó / reguláló / szerep jutott. Ugyanis iii.-ből kitűnik, hogy van olyan egymáshoz viszonyított orientációja az oszcillá-

toroknak / lásd 6. ábra, ahol $k = 0$ /, amely még a legideálisabb átfedés esetén is megakadályozhatja az energiaátadást, kedvező orientáció esetében viszont az energiaátadás gyakoriságát / n_t / a rendezetlen esethez képest többszörösére növelheti, valamint adott irányba /pl. több egymással különböző szögeket bezáró oszcillátorok esetén a reakciócentrum irányába/ vezetheti a gerjesztési energiát.

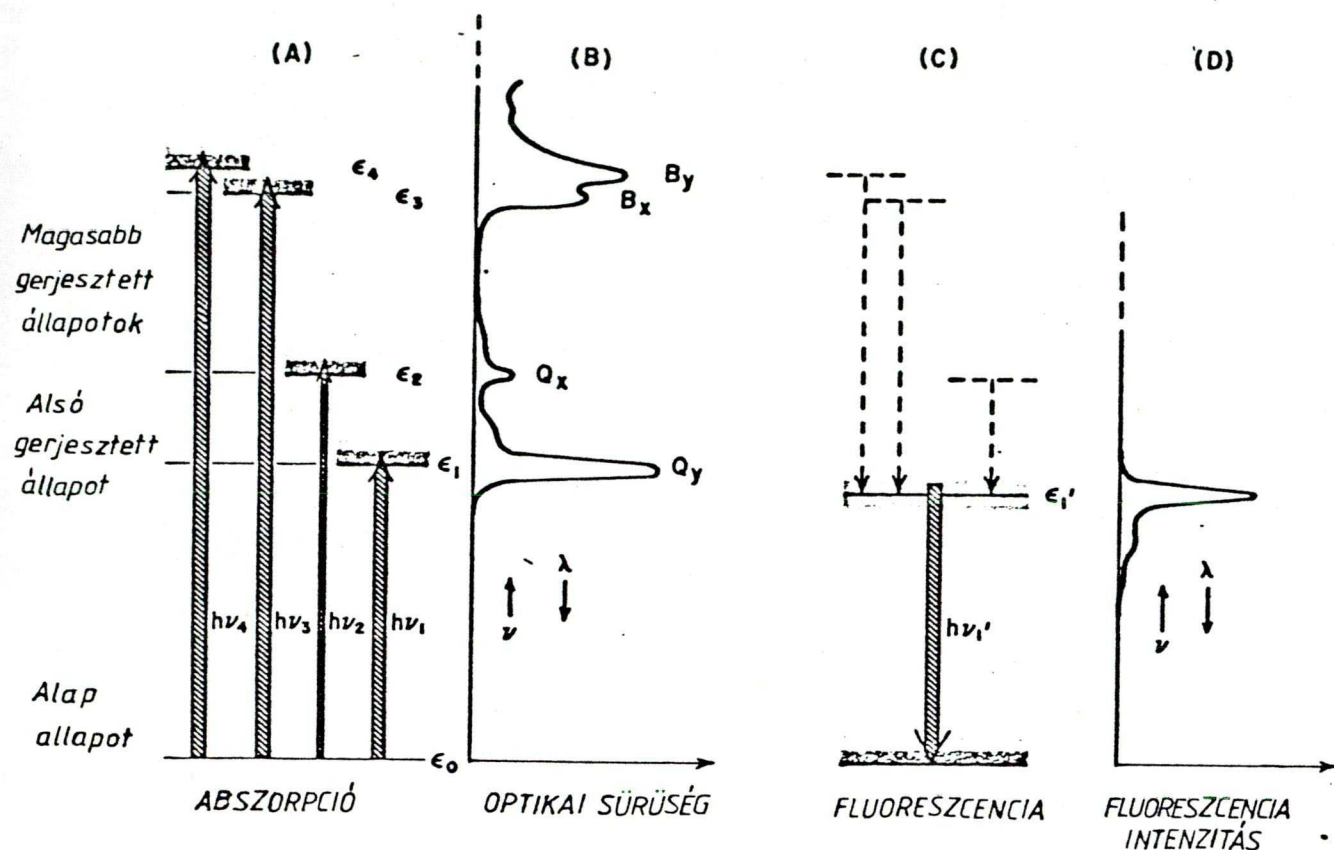
1.3. A pigmentek orientációja

A klorofillok in vivo orientációs tulajdonságai polarizációs spektroszkópia segítségével tanulmányozhatók célszerűen /57,61,62/. Kezdetben polarizációs fénymikroszkóp segítségével vizsgálták a kloroplasztiszok kettőstörését és dikroizmusát /63-65/. Később a különböző pigmentformák orientációját orientált minták lineáris dikroizmusának /66-74/ és polarizált fluoreszcenciájának mérésével /75-80/, valamint fotoszelekciós vizsgálatokkal /81-83/ próbálták meghatározni. A kloroplasztiszok orientálására többféle módszer ismeretes: úsztatással /71/, áramoltatással /84/, szárítással /70,71/, vizkózus szuszpenzió mechanikus felkenésével un. fésüléssel /85/, ülepitéssel /69/, elektromos /66,86/ és mágne-

ses térrel /87,89/. Az orientált minták lineáris dikroizmusának mérésével megállapították, hogy a klorofillformák nagy részének vörös abszorpciós dipólja / Q_y / 30° körüli szöget zár be a fotoszintetikus membrán síkjával oly módon, hogy a szög a hosszabb hullámhosszak felé csökken /61,90/. A klorofillformák közötti nagy abszorpciós átfedések miatt /44,91/ azonban a lineáris dikroizmus spektrumok az egyes formák orientációjára nem nyújtanak közvetlen információt.

A mélyhőmérsékletű fluoreszcencia spektrumokban az egyes sávok jobban elkülönülnek egymástól /44,48,92,93/. A magasabb energianívók igen gyors belső relaxációja / $< 10^{-13}$ s / miatt /94,96/ csak a vörös abszorpciós dipólnek feleltethető meg fluoreszcencia /7. ábra/. Az orientált kloroplasztiszok által mélyhőmérsékleten emittált fluoreszcencia polarizációja így a különböző emittáló klorofillformák Q_y átmeneteinek egymáshoz ill. a fotoszintetikus membrán síkjához viszonyított elrendeződéséről nyújt információt. Bár így csak a klorofillformák tanulmányozhatók, de az emisszió mint belső szonda érzékenyen mutatja a klorofill-antenna szerkezetében jelentkező finom megváltozásokat /97,98/.

Ez a megfontolás képezte alapját azon vizsgálatoknak, amelyekben Garab és Breton 1975 - ben mágneses térben orientált spenót kloroplasztiszok alacsonyhőmérsékle-



7. ábra. A klorofillok abszorpciója és emissziója.

Az ábra szemlélteti az összefüggést az energia szintek, az abszorpciós spektrum valamint a fluoreszcencia spektrum között. Sauer alapján /10/.

tü fluoreszcencia spektrumok polarizációját tanulmányozva öt különböző klorofillformát különített el /80/. Így lehetőség nyílt arra, hogy az egyes emissziós dipólok membránsikkal bezárt szögét, és kölcsönös orientációjukat meghatározzuk.

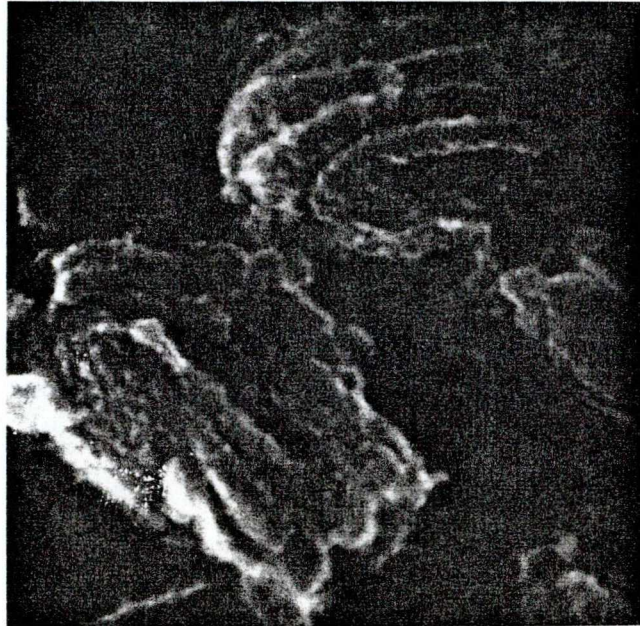
Az abszorpciós és emissziós dipólok membránsikkal bezárt szögeinek meghatározásakor azonban az eddigi vizs-

gálatoknál idealizált - egymással párhuzamos, sík - membránrendszert, és a kloroplasztiszok tökéletes orientálódását tételezték fel. Ismeretes, hogy a kloroplasztiszokban a fotoszintetikus membránok nagy része szférikusán kihajlik a síkból, a felületek szélei pedig teljesen görbültek /lásd 8. ábra/.

E tényezők miatt a mért lineáris dikroizmus és fluoreszcencia polarizációs eredmények a valódi szögeloszlásokat eltorzítva tükrözik /100,101/. Figyelembe kell vennünk azt is, hogy a szuszpenziókban a kloroplasztiszoknak csak egy bizonyos hányada orientálódik. Ezért a mért és az in situ polarizációs hányadosok lényegesen különbözhetnek egymástól.



8. ábra. a./ Kukorica mezofill kloroplasztiszának elektronmikroszkópos képe /20000 x nagyítás/.



8. ábra. b./ Kukorica mezofill kloroplasztiszaiból izolált gránumok pásztázóelektronmikroszkópos felvétele /150000 x nagyítás/ /109/.

1.4. Célkitűzés

Vizsgálataink célja az volt, hogy a klorofill-a in vivo emissziós dipóljainak egymáshoz és a membrán normálisához viszonyított orientációjára az eddigieknél pontosabb becslést adjunk.

Kukorica mezofill kloroplasztiszainak mélyhőmérsékletű fluoreszcencia polarizációs hányados spektrumai alapján figyelembe véve a kloroplasztiszok elektronmikroszkópos szerkezetét, és a szuszpenzió orientálódásának mértékét hat különböző klorofill-a emissziós átmeneti vektor orientációjára adtunk megközelítő értéket. Megállapítottuk, hogy az emissziós dipólok az irodalomban közölt értékeknél jobban besimulnak a membrán síkjába és nagyobb szögintervallumban helyezkednek el. Az általunk megbecsült szögrendeződést figyelembe véve az orientációs faktor értéke is növekszik, és ezáltal növekszik az energiaátadás számított hatásfoka is.

2. A N Y A G É S M Ó D S Z E R

2.1. A mérendő anyag előkészítése

A kísérletekhez 10 napos üvegházi kukorica /Zea mays MV 861/ csiranövények első leveleiből izolált kloroplasztiszokat használtunk.

Az izoláláshoz Björkman /102 / ill. Woo és mts.-i /103 / által használt, laboratóriumunkban módosított módszerét használtuk. Az izolálást 0,3 M szacharózt és 0,01 M KCl-ot tartalmazó 0,05 M-os foszfátpufferben /pH 7,2/ végeztük /104 /. A mezofill sejteket Vir-Tis "45" /Typ. Super 30/ késés homogenizátorral mechanikusan választottuk el. A szűrletben lévő sejttörmelékét 3000 x g-vel 2-3 sec alatt leülepitettük. A felüluszóban lévő plasztiszokat 20 percig 3000 x g-vel ülepitettük. A plasztiszokat az izoláló közegben felszuszpendálva úgy higitottuk, hogy glicerinnel 1:2 arányban való elegyítés után a mérendő anyag 12-15 nmol/ml klorofillt tartalmazzon.

2.2. A pigmenttartalom meghatározása

A klorofilltartalmat a plasztiszszuszpenziókból acetonnal kioldott etiléterbe átmosott pigmentoldat abszorpciójának mérésével határoztuk meg French /105 / többhul-

lámhossz módszerével az alábbi képletek alapján:

$$\text{kl-a nmol/ml} = 0,96 / 11,92 \text{ OD}_{662} - \text{OD}_{644} /$$

$$\text{kl-b nmol/ml} = 2,90 / 6,21 \text{ OD}_{644} - \text{OD}_{662} /$$

$$\text{kar nmol/ml} = 0,24 / 35,63 \text{ OD}_{480} - \text{OD}_{644} /$$

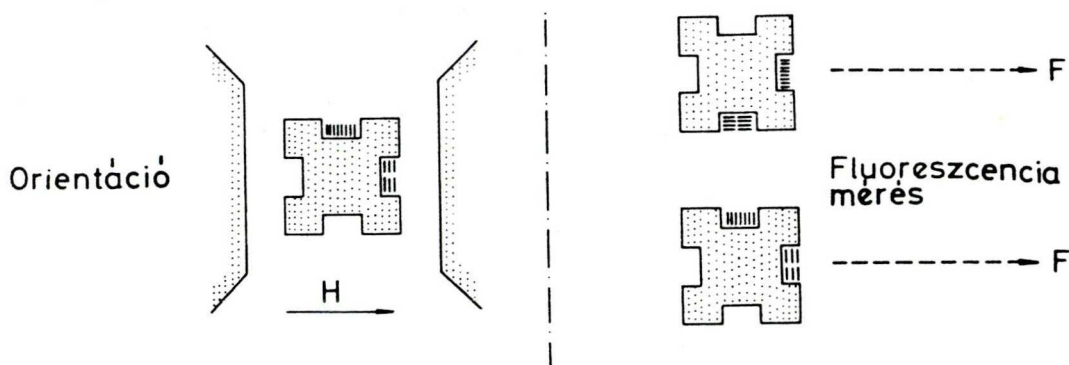
ahol az OD_{662} , OD_{644} és OD_{480} rendre 662, 644 és 480 nm-nél mért optikai sűrűséget jelentik. A nullázás 700 nm-nél történt. Az abszorpció méréseket Unicam SP 1800 B UV-VIS spektrofotométerrel végeztük.

2.3. Elektronmikroszkópos preparátumok készítése

A 30% és 60%-os glicerint tartalmazó és glicerinnel mentes szuszpenziókat 0,2% -os glutáraldehidben fixáltuk /106 /. Fixálás után 10 percig 3000 x g -vel ülepitettük. A fixálót 18 órán keresztül 0,2 M -os foszfát pufferrel / pH 7,2 / kimostuk. Az utófixálást Millonig /107 / szerint pufferezett 1% -os ozmiumtetroxid oldatban 1 óra hosszat végeztük. Majd egy felszálló alkoholsorozatban víztelenítettük, amely során a mintákat 70% -os alkoholban 20 percig telített uranilacetát oldattal kontrasztosítottuk. Aralditba ágyazva kapszuláztuk. A metszeteket Tesla BS 478 ultramikrotommal készítettük majd "400 mesh" -es rézrostélyra vittük és Reynolds /108 / nyomán ólomcitráttal kontrasztosítottuk. Ezután egy Zeiss / HBA-1/ típusú vákuumgőzölőben szénhártyával fedtük be. A metszeteket JEOL 100B típusú elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

2.4. Orientáció mágneses térrel

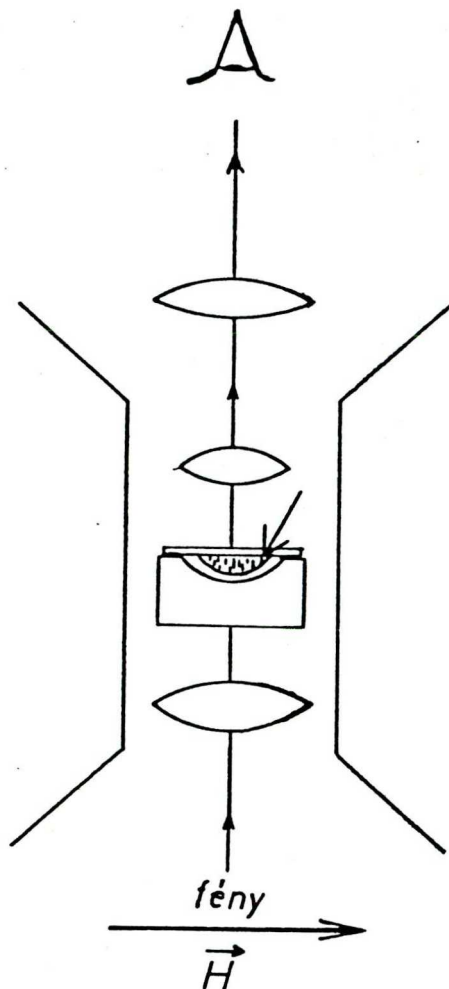
A négyoldalú mintatartóra a mintahelyre felcseppentett glicerines plasztiszszuszpenziót mikroszkóp fedőlemezrel lefedtük és az elektromágnes / Phylatex 1316 Wdg / pólusai közé helyeztük / lásd 9. ábra / / 80. / . Az alkalmazott térerősség 14 kGauss volt.



9. ábra. A mágneses orientáció és az orientált minta fluoreszcenciájának mérési sémája. Az ábrán látható kis párhuzamos vonalak az orientált membránokat szemléltetik.

A plasztiszokat 2-2,5 percig orientáltuk a mágneses térben, majd a tér kikapcsolása nélkül cseppfolyós nitrogén segítségével fokozatosan lehittöttük és befagyasztottuk a rendszert -120°C hőmérsékleten / 80 , 89. /. Ezután a mintatartót egy ugyancsak -120°C -ra előhűtött üveg-dewarba helyeztük. A cseppfolyós nitrogén gőzfázisában lévő minta hőmérsékletét a dewar alján lévő folyékony nitrogén forralásával stabilizáltuk. A hőmérsékletet a mintatartóba illesztett réz-konstantán

termocellemmel és a hozzákapcsolt digitális voltmérővel
/ TR - 1652 - 2 / határoztuk meg.



10. ábra. A mágneses orientáció fénymikroszkópos megfigyelése. Az ábrán a függőcseppben lévő kis párhuzamos vonalak / a nyíl mutatja / az orientált plasztiszokat szemléltetik.

2.5. Az orientálódás mértékének meghatározása

A plasztiszok orientálódásának mértékét az elektromágnes pólusai közé beépített fénymikroszkóppal / lásd 10. ábra / függőcseppben immerziós objektívvel



1500 x - os nagyításnál 14 kGauss térerősségnél vizsgáltuk. Fényképfelvételeket készítettünk a plasztiszokról a tér bekapcsolása előtt, közben, a bekapcsolás után és a kikapcsolás után is.

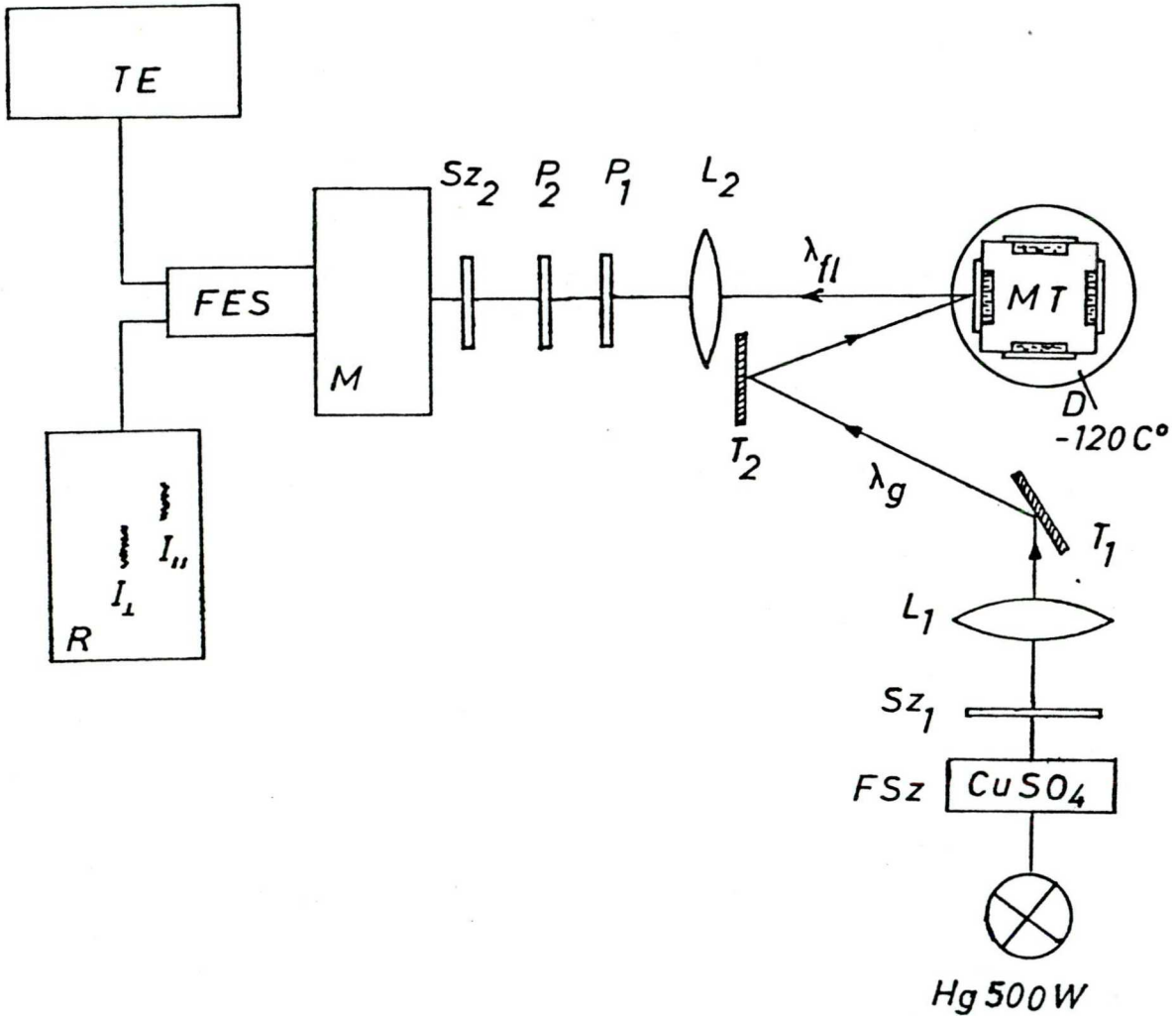
2.6. Orientáció fésüléssel

A leülepitett plasztiszokat 25% - os polivinil-alkoholban mechanikusan mókusszórecsettel üveglemezre vittük fel, és fésüléssel orientáltuk / 85 /. Az így orientált mintákat felragasztottuk a mintatartóra és a fluoreszcencia polarizációját - 120 °C -on vizsgáltuk.

2.7. A mélyhőmérsékletű polarizált fluoreszcencia mérése

A polarizált fluoreszcencia mérését egy házilag összeállított spektrofluoriméteren végeztük, amelynek a blokk-sémája a 11. ábrán látható. A gerjesztésre HBO 500 W - os Hg lámpa 436 nm-es vonalát használtuk / FSZ: folydékszűrő 0,5 M CuSO₄ 3 cm ; SZ₁ : üvegszűrő Hg 436 067 /. A polarizálatlan gerjesztő fényt /λg/ az L₁ lencsén keresztül a T₁ , T₂ tükrök segítségével a - 120°C -ra lehűtött D üveg-dewarban lévő négyoldalu réz MT mintatartón kialakított mintahelyre képez-

tük. A fluoreszcencia mérést elsősorban megfigyeléssel végeztük. Az L_2 lencse segítségével leképezett fluoreszcencia fényt λ_{fl} a P_1 , P_2 polarizátorok-



11. ábra. A mélyhőmérsékletű polarizált fluoreszcencia spektrumok meghatározására használt berendezés bloksémája / jelmagyarázat a szövegben / .

kal analizáltuk úgy, hogy a polaroid-szűrők közül a P_2 az analizátor, amelynek a polarizációs síkja egy

vertikális és egy horizontális pozíciót vehet fel, a P_1 polaroid polarizációs síkje a P_2 -vel 45° -os szöget zár be, ami biztosítja, hogy a monokromátorba mindig azonos polarizációjú fény kerüljön. A fluoreszcencia fény az SZ₂ /OG 2, 1 mm/ keresztező üvegszűrőn át jut az SPM-2 rácsos monokromátor /f = 400 mm, 650 vonal/mm, 570 nm/ belépő részére. A monokromátorból a fény a FES fotoelektronsokszorozóra /RCA 31034 - a/ kerül, amelynek jelét az R /G1 - B1/ vonalirón regisztráltuk. A FES negatív nagyfeszültségét /1450-1550 V/ a TE stabilizált nagyfeszültségű tápegység /Gamma system: KFKI NB-101/ szolgáltatta.

A fluoreszcencia spektrumokat a rendszer spektrális átviteli görbéjére korrigáltuk.

Megmértük a fluoreszcencia vertikális I_v és horizontális I_h intenzitását és meghatároztuk az intenzitások arányát /FP = I_v/I_h / és különbségét /FD = $I_v - I_h$ /. Az orientált kloroplasztiszoknál, amikor a megfigyelés iránya a membrán síkjával párhuzamos, $I_v = I_{||}$ és $I_h = I_{\perp}$. Így a szokásos terminológia szerint a fluoreszcencia polarizációs hányadosa:

$$FP = \frac{I_{||}}{I_{\perp}}$$

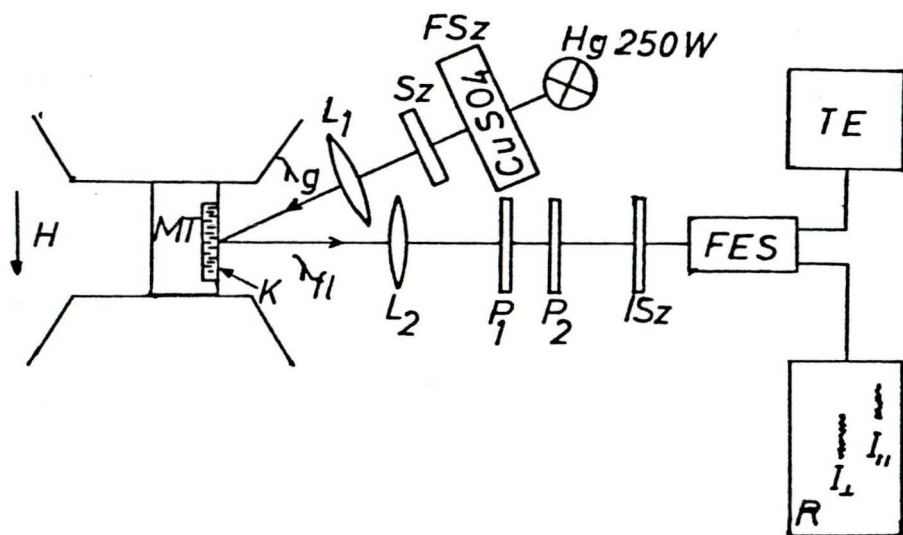
különbsége:

$$FD = I_{||} - I_{\perp}$$

2.8. A polarizált fluoreszcencia mérése szobahőmérsékleten

A méréseket egy házilag összeállított berendezésen végeztük, melynek a blokksémáját a 12. ábra szemlélteti.

A plasztiszszuszpenziót az elektromágnes pólusai közé helyezett MT mintatartóba illesztett lmm-es küvettába helyeztük. Gerjesztésre DRS 250 W-os Hg lámpa 436 nm-es



12. ábra. A szobahőmérsékletű polarizált fluoreszcencia méréséhez használt berendezés blokksémája.

/Jelmagyarázat a szövegben./

/ λ_g / vonalát használtuk /FSz: folyadékszűrő: 0,5 M CuSO_4 , 3 cm, Sz: üvegszűrő: Hg 436 067/, amelyet az L_1 lencsével a K küvettára képeztünk le. Elülsőlapos megfigyelést alkalmaztunk.

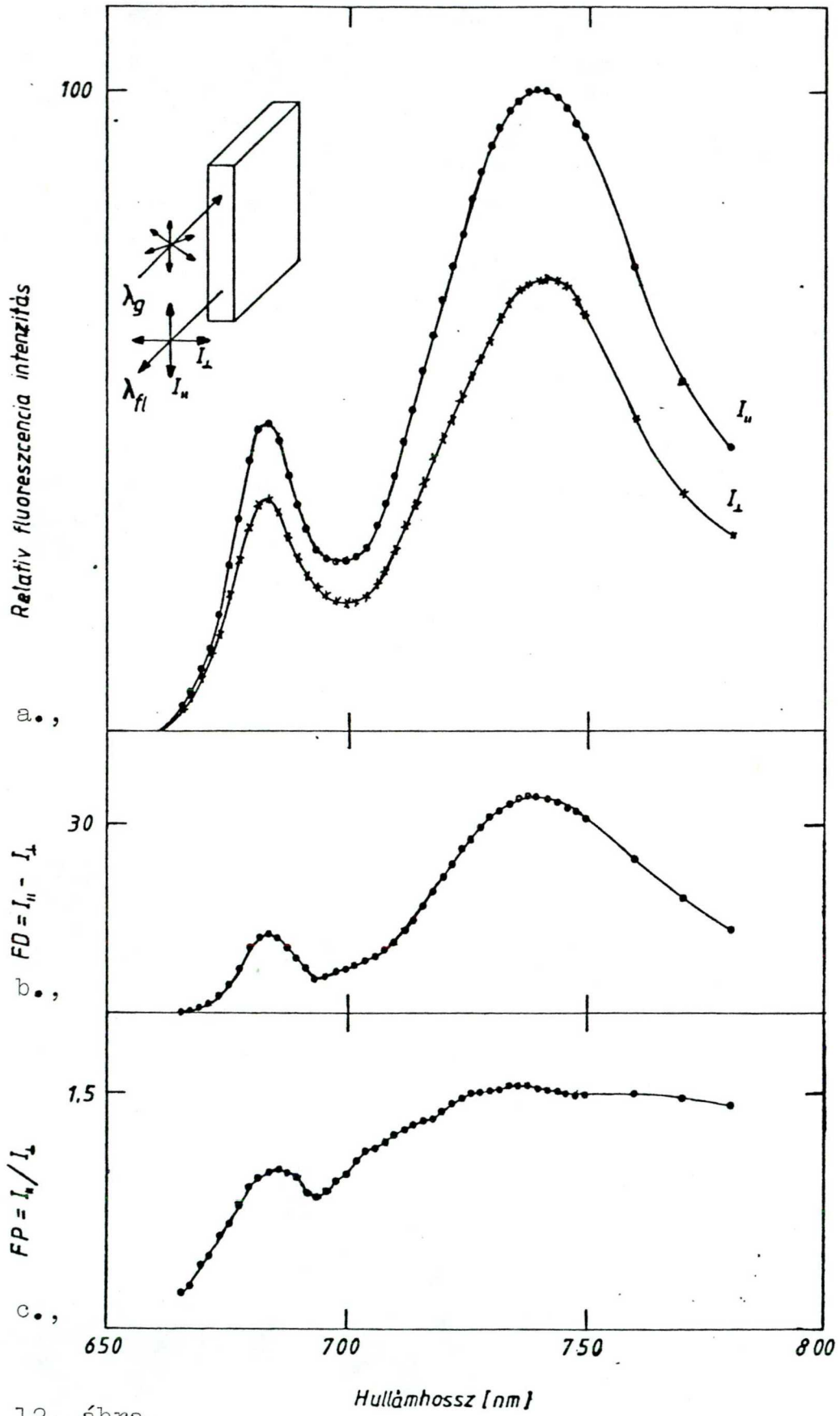
Az I_{\parallel} és I_{\perp} fluoreszcencia intenzitásokat a 2.7.-ben leírtakhoz hasonlóan határoztuk meg az emissziós maximum közelében /ISz : interferenciaszűrő, Oriel 680,5 nm, félsáv-szélesség: 10 nm/.

3. E R E D M É N Y E K

3.1. A fluoreszcencia polarizációs hányados és különbségi spektrumok

A 12./a ábrán a kloroplasztiszok jellegzetes mélyhőmérsékletű fluoreszcencia spektrumát láthatjuk, amelyet úgy vettünk fel, hogy az orientált minta fluoreszcenciáját polarizátorok segítségével felbontottuk egy, az orientált fotoszintetikus membránokkal párhuzamos $I_{||}$ és egy arra merőleges I_{\perp} lineárisan poláros összetevőre, és ezeket rajzoltuk fel a hullámhossz függvényében. A 12./c. ábrán a két szinkép hányadosa a fluoreszcencia polarizációs hányados $FP = I_{||}/I_{\perp}$ spektruma látható. A 12./b. ábrán pedig az $FD = I_{||} - I_{\perp}$ mennyiség hullámhossztól való függését figyelhetjük meg.

Az FP spektrum jól megegyezik a spenót kloroplasztiszokra közölt irodalmi adatokkal /80/. A kukorica mezofill plasztiszai is jól tükrözik a mélyhőmérsékletű fluoreszcencia sávok összetett jellegét - legalább öt különbözőképpen orientált fluoreszkáló klorofillforma jelenlétéről tanuskodnak. Itt is megfigyelhető, hogy az FP értéke az F 675-re a legalacsonyabb és az F 735-re a legmagasabb, jól látható az F 685-nél található kis plató, az F 720-nak tulajdonított váll és az F 695-nek betudható völgy.

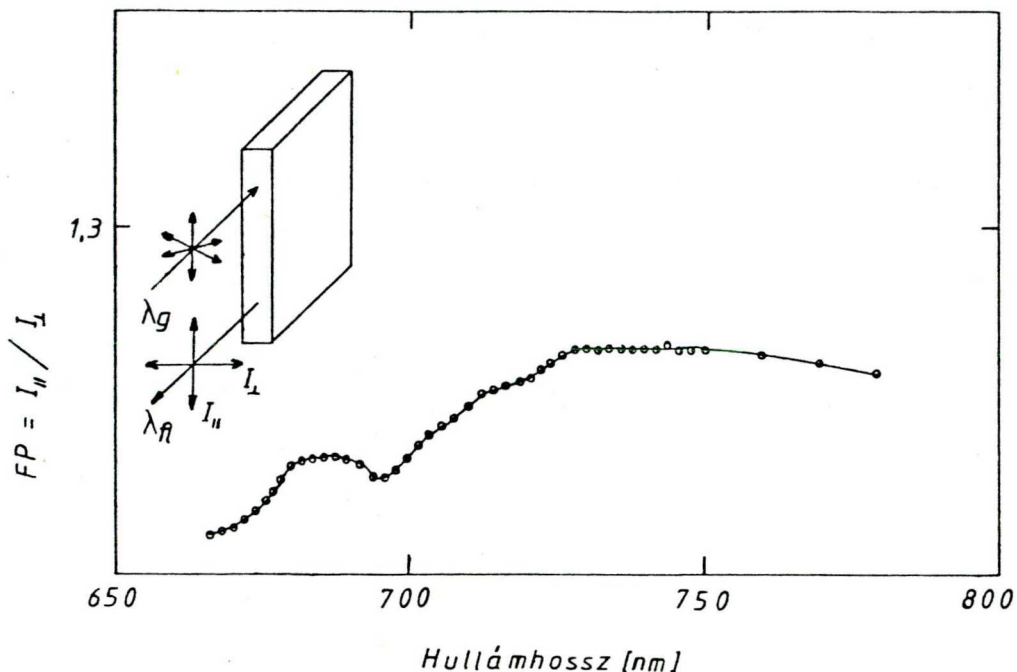


12. ábra.

12. ábra. Mágneses térben orientált kloroplasztiszok mélyhőmérsékletű -120°C polarizált fluoreszcencia /a/, a fluoreszcencia polarizációs különbségei /b/ és fluoreszcencia polarizációs hányados /c/ spektruma.

Érdemes megfigyelni azt is, hogy a polarizációs különbségi spektrumban /12./b. ábra/ 702 nm körül egy jól kivehető váll látható, ezzel összhangban az FP spektrumban is /12./c. ábra/ egy enyhe törés 702 nm körül. Mindez azt valószínűsíti, hogy feltételezhetünk irodalmi adatokkal egybehangzóan egy olyan kicsi fluoreszcencia sávot, amelynek a maximumhelye 702 nm körül van /44,48,49,113/. Az FP spektrumot tanulmányozva észrevehetjük még azt is, hogy 750 nm után az FP értéke fokozatosan csökken. Ez a spektrum ezen tartományában már intenzíven jelentkező vibrációs nivókból eredő fluoreszcencia zavaró hatásának tulajdonítható.

Breton és mts.-i különböző módszerekkel orientált kloroplasztiszok LD spektrumait összevetve megállapították, hogy a mágneses tér nem befolyásolja a pigmentek relatív orientációját /61,77,114/. Ugyanezt tudtuk demonstrálni a mágneses térrel orientált /12./c. ábra/ és a fésüléssel orientált kloroplasztiszok /13. ábra/ mélyhőmérsékletű -120°C FP spektrumainak hasonlósága alapján. Látható, hogy az FP értékek nagysága különböző ugyan, de a spektrális menetük megegyezik, ami azt jelenti, hogy az orientá-



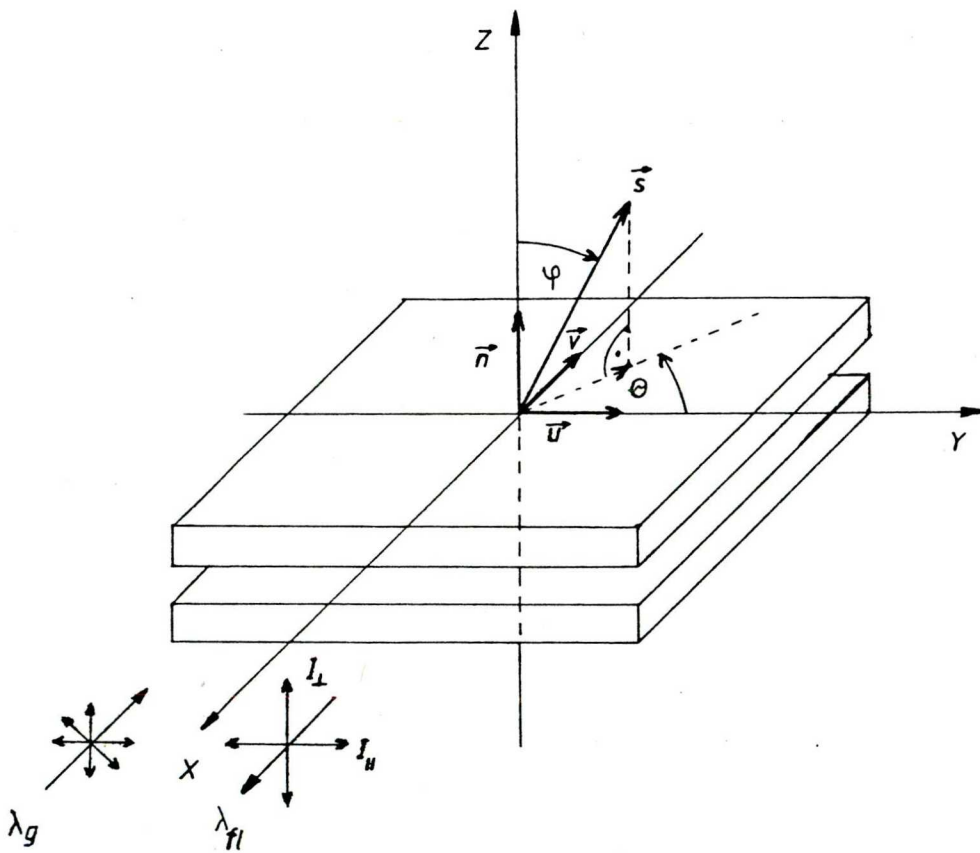
13. ábra. A fésüléssel orientált kloroplasztiszok mélyhőmérsékletű -120°C fluoreszcencia polarizációs hányados spektruma.

ciós eljárás csak a kloroplasztiszokat és ezáltal a fotoszintetikus membránokat rendezi, de a klorofillformák relatív orientációját /szögeloszlását/ nem befolyásolja. Az FP értékek nagyságának az eltérése arra utal, hogy a fésüléssel orientációs eljárással kevesebb kloroplasztiszt tudunk egyirányba rendezni mint mágneses térben.

3.2. Elméleti megfontolások az "ideális" sík membrán esetére

A 14. ábrán egy tökéletesen orientált, ideálisan sík membránrendszert figyelhetünk meg. A vizsgálandó egységnyi

hosszuságu emissziós dipólvektort jelöljük \vec{s} -el. Tekintünk egy x, y, z Descartes-féle koordinátarendszert a 14. ábrának megfelelően. A gerjesztést és a polarizált fluoreszcencia intenzitások megfigyelését végezzük az x tengely irányából.



14. ábra. A számításokhoz használt "ideálisan" sík fotoszintetikus membrán vázlat. /Jelmagyarázat a szövegben./

Jelölje φ az s -nek a sík normálisával bezárt szögét, θ pedig az \vec{s} xy síkra való merőleges vetületének az y tengellyel bezárt szögét, $\vec{u}, \vec{v}, \vec{n}$ -nel pedig az egyes koordinátatengelyek irányába mutató egységvektorokat jelöljük.

\vec{s} -t x,y,z-ben $\vec{s}_x, \vec{s}_y, \vec{s}_z$ összetevőkre bontva:

$$\vec{s} = \vec{s}_x + \vec{s}_y + \vec{s}_z \quad / 1 /$$

és $\vec{u}, \vec{v}, \vec{n}$ segítségével:

$$\vec{s} = \vec{s}_x + \vec{s}_y + \vec{s}_z = \sin \psi \cos \theta \vec{u} + \sin \psi \sin \theta \vec{v} + \cos \psi \vec{n} \quad / 2 /$$

Felhasználva, hogy a kibocsátott fluoreszcencia intenzitás az alábbi skalárszorzat négyzetének átlagával arányos - arányossági tényezőjét egységnyinek véve:

$$\begin{aligned} I_{\parallel} &= \overline{|\vec{s}_y|^2} = \overline{|\vec{s}_u|^2} \\ I_{\perp} &= \overline{|\vec{s}_z|^2} = \overline{|\vec{s}_n|^2} \end{aligned} \quad / 3 /$$

/ 2 /-t felhasználva:

$$\begin{aligned} I_{\parallel} &= \overline{\sin^2 \psi \cos^2 \theta} = 1/2 \overline{\sin^2 \psi} \\ I_{\perp} &= \overline{\cos^2 \psi} \end{aligned} \quad / 4 /$$

Igy az FP definíciójának megfelelően:

$$FP = \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} = \frac{1}{2} \frac{\overline{\sin^2 \psi}}{\overline{\cos^2 \psi}} \quad / 5 /$$

Ha a membránok nem orientálódnak vagy ha az emissziós dipólok a membrán normálisához viszonyítva rendezetlenek, akkor:

$$\begin{aligned} \overline{\sin^2 \psi} &= \frac{2}{3} \\ \overline{\cos^2 \psi} &= \frac{1}{3} \end{aligned} \quad / 6 /$$

és így:

$$FP = 1 \quad / 7 /$$

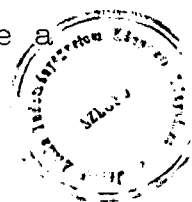
Fontos megjegyezni, hogy az $FP = 1$ és hasonlóan az $LD = 0$ nemcsak az orientálatlan esetben áll fenn, hanem az orientációs mérések un. "mágikus szöge" esetén is az- az $\varphi = \varphi_0$ esetén, ahol φ_0 -t / 5 /-ből $FP = 1$ -et behelyet- tesítve kapjuk:

$$\varphi_0 = 54^{\circ}34'$$

Tehát $FP = 1$ és $LD = 0$ esetén nem dönthető el, hogy a dipólok a membránsík normálisával / \vec{n} / $54^{\circ}34'$ -es szö- get zárnak-e be vagy teljesen rendezetlenek.

3.3. Elméleti meggondolások az un. "reális" membránok esetére

In situ és izolált kloroplasztiszok szerkezetének elek- tronmikroszkópos vizsgálata alapján nyilvánvaló, hogy a fo- toszintetikus membránoknak csak egy része párhuzamos egy- mással ill. a kloroplasztisz "egyenlitői" síkjával / 99, 101/, amely mágneses orientáció esetén pontosan merőleges a mágneses tér irányára / 90 /. A 15. ábrán látható elek- tronmikroszkópos felvételekből is kiderül, hogy a membrá- nok tulnyomó többsége gömbhéjszerű, amelyek különböző mér- tékben domborodnak ki az egyenlitői síkból. A gránumok dön- tő többsége is a sztrómalamellák által vezetett gömbhéjak- nak megfelelően helyezkedik el, és ennek megfelelően a grá- numok "forgástengelyei" is különböző szögeket zárnak be a





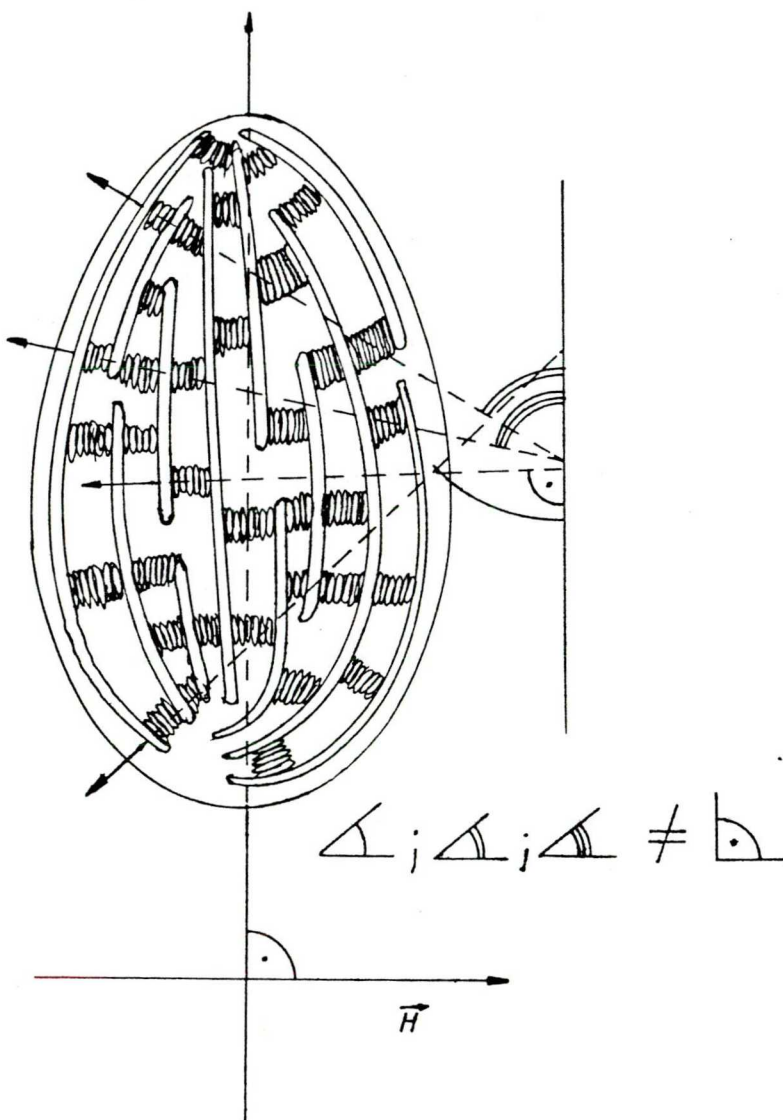
15. ábra. Kukorica mezofillumából izolált kloroplasztiszok elektronmikroszkópos felvétele /20000 x-es nagyítás/.

kloroplasztisz egyenlítői síkjának normálisával. A kloroplasztisz elhelyezkedését a mágneses térben, valamint a sztróma lamellák és a gránumok nagy részének gömbhéjszerű elrendeződését a 16. ábra szemlélteti. Az előzőekben felsorolt tulajdonságok figyelembevételéhez tekintsük a következő un. "szférikus membrán-modell" /17. ábra/.

Az \vec{s} vektor, hasonlóan az előző fejezethez / 1 / és / 2 /-ből:

$$\vec{s} = \sin \varphi \cos \theta \vec{u} + \sin \varphi \sin \theta \vec{v} + \cos \varphi \vec{n} \quad / 8 /$$

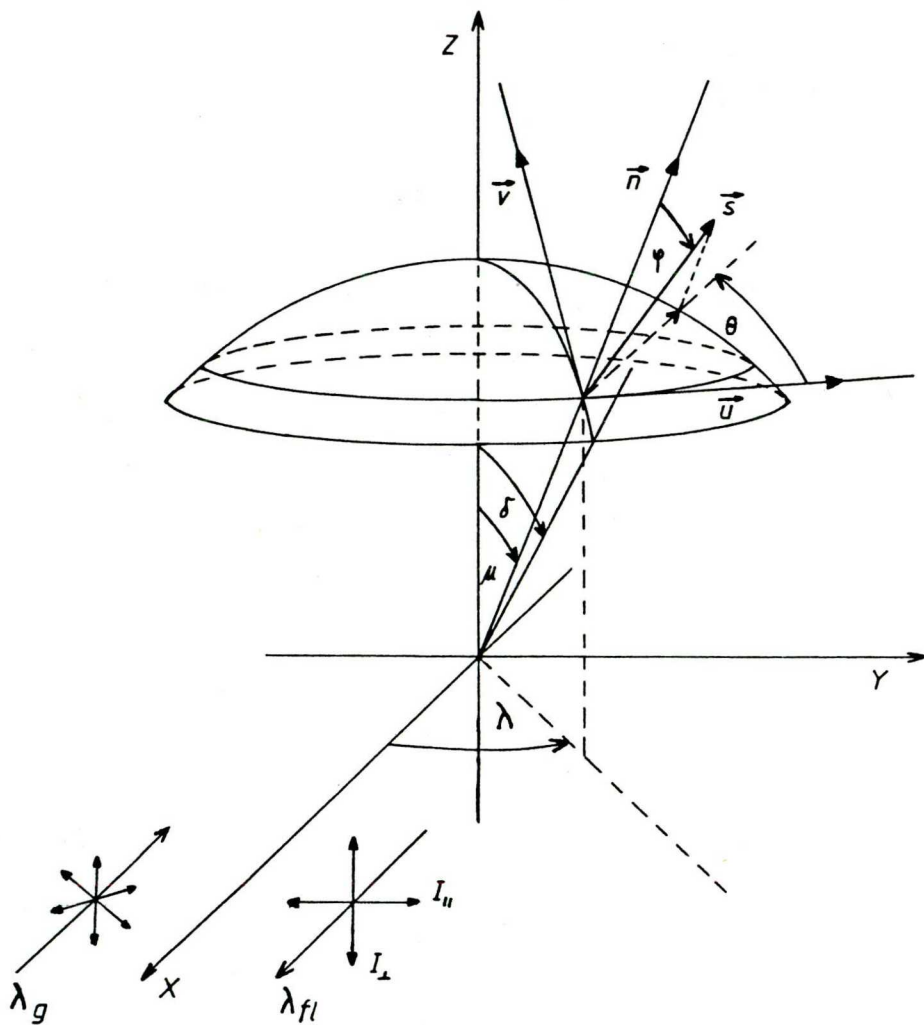
ahol φ és θ a 14. ábrának megfelelően a már tárgyalt "ideális" sík membrán eseténél definiáltak megfelelően itt is az s helyzetét adják meg $\vec{u}, \vec{v}, \vec{n}$, által kifeszített koordi-



16. ábra. A kloroplasztisz elhelyezkedése a mágneses térben /keresztmetszeti vázlat/.

náta rendszerben /17. ábra/. A $\mu \in [0, \delta]$; $\lambda \in [0, 2\pi]$ pedig az \vec{n} normális helyzetét adják meg az x,y,z koordinátarendszerben, $\delta \in [0, \frac{\pi}{2}]$ a szféricitás paramétere. A gerjesztés és a megfigyelés az előző esethez hasonlóan itt is az x irányából történik.

Az x, y, z rendszerben nézve az $\vec{u}, \vec{v}, \vec{n}$ a λ és μ segítségével a következő alakot ölti:



17. ábra. A számításokhoz használt ún. "szférikus membrán" vázlat. /Jelmagyarázat a szövegben./

$$\vec{u} \begin{vmatrix} -\sin \lambda \\ \cos \lambda \\ 0 \end{vmatrix} ; \quad \vec{v} \begin{vmatrix} -\cos \mu \cos \lambda \\ -\cos \mu \sin \lambda \\ \sin \mu \end{vmatrix} ; \quad \vec{n} \begin{vmatrix} \sin \mu \cos \lambda \\ \sin \mu \sin \lambda \\ \cos \mu \end{vmatrix} \quad / 9 /$$

most nézzük s-nek y és z irányu komponensét / 8 / és / 9 / -
-ből:

$$\begin{aligned} \vec{s}_y &= \cos \lambda \sin \varphi \cos \theta - \cos \mu \sin \lambda \sin \varphi \sin \theta + \sin \mu \sin \lambda \cos \varphi \\ \vec{s}_z &= + \sin \mu \sin \varphi \sin \theta + \cos \mu \cos \varphi \end{aligned} \quad /10/$$

λ -ra és θ -ra átlagolva

$$s_y^2 = I_{\parallel} = \frac{1}{4} \sin^2 \varphi + \frac{1}{4} \overline{\cos^2 \mu} \sin^2 \varphi + \frac{1}{2} \overline{\sin^2 \mu} \cos^2 \varphi \quad /11/$$

$$s_z^2 = I_{\perp} = \frac{1}{2} \overline{\sin^2 \mu} \sin^2 \varphi + \overline{\cos^2 \mu} \cos^2 \varphi$$

jelöljük $\overline{\cos^2 \mu} = t$ /12/

így:

$$FP = \frac{\frac{1}{4} / 1+t / \sin^2 \varphi + \frac{1}{2} / 1-t / \cos^2 \varphi}{t \cos^2 \varphi + \frac{1}{2} / 1-t / \sin^2 \varphi} \quad /13/$$

Tekintsük a $t = 1$ esetet ekkor a $\delta = 0$. Tehát a $t = 1$ esetben a "szférikus" membrán átmegy az "ideális" sík membránba:

$$FP = \frac{1}{2} \frac{\overline{\sin^2 \varphi}}{\overline{\cos^2 \varphi}} \quad /14/$$

t értékét az alábbiak szerint számíthatjuk:

$$\begin{aligned} t = \overline{\cos^2 \mu} &= \frac{\int_0^{\delta} \cos^2 \mu \sin \mu d\mu}{\int_0^{\delta} \sin \mu d\mu} = \frac{-\int_0^{\delta} \cos^2 \mu d\mu}{-\int_0^{\delta} \cos \mu d\mu} = \\ &= \frac{1}{3} \frac{1 - \cos^3 \delta}{1 - \cos \delta} \end{aligned}$$

azaz $t = \frac{1}{3} / 1 + \cos \delta + \cos^2 \delta / / 15 /$

$\delta = \frac{\pi}{2}$ ($t = \frac{1}{3}$) esetén a membránok - szimmetriaokok miatt - zárt gömbfelületet alkotnak, kitüntetett irány hiányában orientálhatatlanok és ψ bármely értékére FP=1.

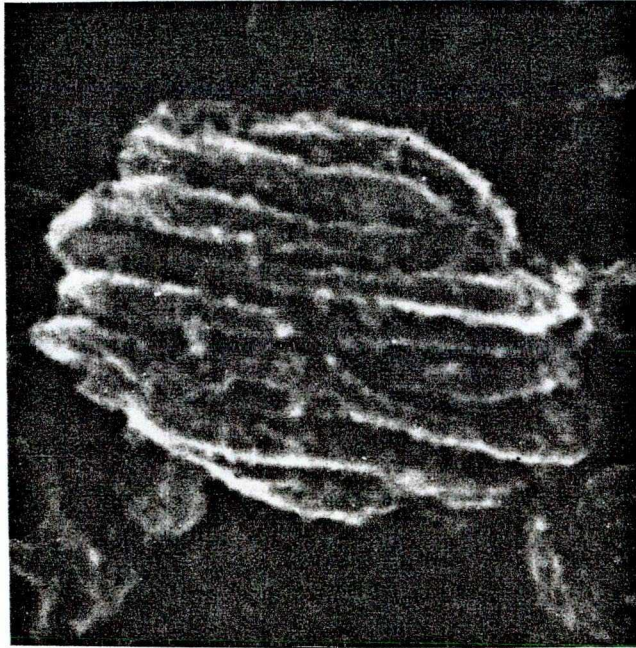
Olyan membránokra, amelyeknél $\delta = 60^\circ$, $t = \frac{7}{12}$ a fluoreszcencia polarizáció hányados ψ -től való függésére a következő kifejezést kaphatjuk:

$$FP = \frac{\frac{19}{2} \sin^2 \psi + 5 \cos^2 \psi}{14 \cos^2 \psi + 5 \sin^2 \psi} / 16 /$$

Legyen pl. FP = 1,5 ha $\delta = 0$ akkor $\psi = 60^\circ$
ha $\delta = \frac{\pi}{3}$ akkor $\psi = 70^\circ 15'$, / 17 /

Tehát amint az az utóbbi példából is kitűnik, egyáltalán nem elhanyagolható, sőt nagyon is lényeges a különbség a ψ szögre kapott értékek között attól függően, hogy "ideális" sík membránnal vagy különböző "szféricitásu" membránokkal számolunk.

Az eddigi számításoknál a membránokat hajlitott lapokként kezeltük. Nem vettük figyelembe azonban a membránok un. marginális részén található pigmentmolekulákból eredő fluoreszcencia polarizációs hányadosát. Ez utóbbi esetet szemlélteti a 18. ábra és 19. ábra.



18. ábra. Kukorica mezofill kloroplasztiszaiból izolált gránumok pásztázóelektronmikroszkópos felvétele /150000 x nagyítás/ /109/.

Hasonlóan, mint / 2 / és / 8 /:

$$\vec{s} = \sin \varphi \cos \theta \vec{u} + \sin \varphi \sin \theta \vec{v} + \cos \varphi \vec{n} \quad / 18 /$$

Most x, y, z koordináta rendszerben fejezzük ki $\vec{u}, \vec{v}, \vec{n}$ -t $\lambda \in [0, \pi]$ és $\gamma \in [-\frac{\pi}{2}, \frac{\pi}{2}]$ segítségével /19. ábra/:

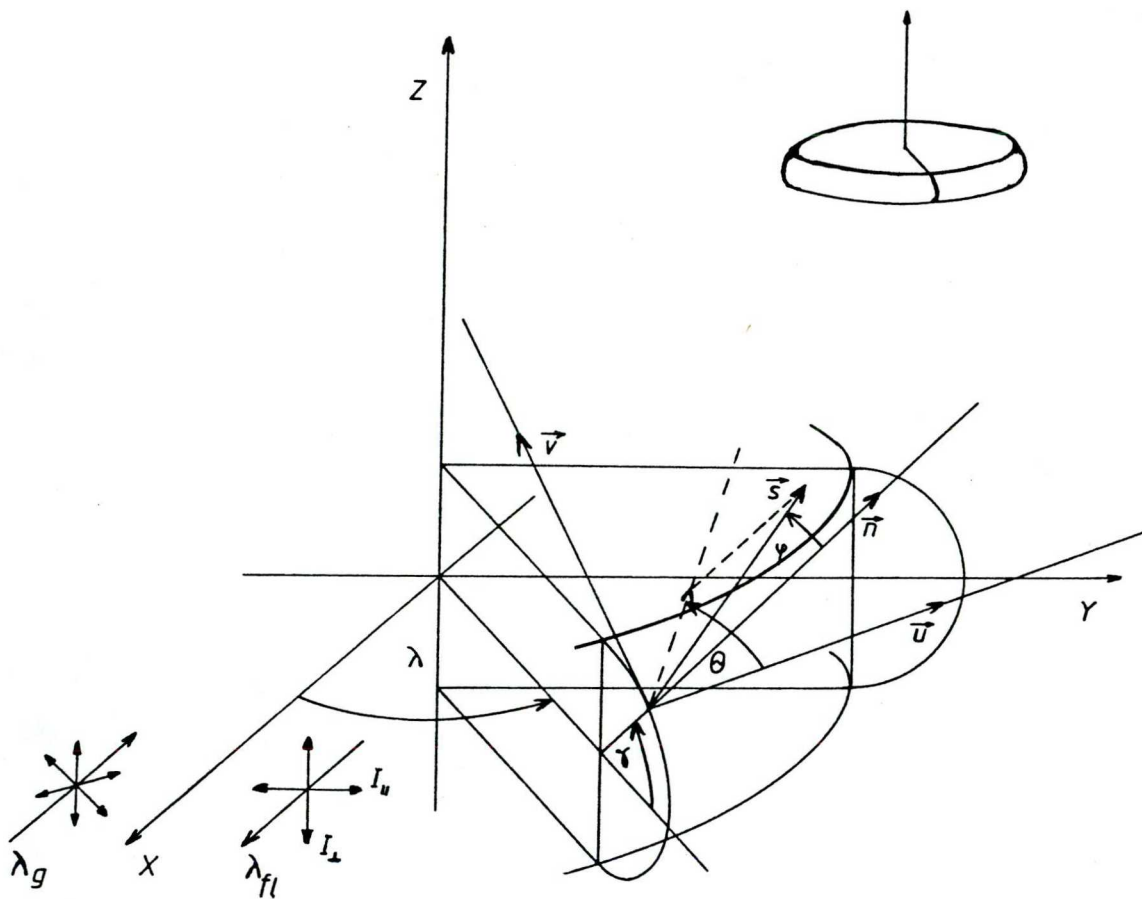
$$\vec{u} \begin{cases} -\sin \lambda \\ \cos \lambda \\ 0 \end{cases} ; \quad \vec{v} \begin{cases} -\sin \gamma \cos \lambda \\ -\sin \gamma \sin \lambda \\ \cos \gamma \end{cases} ; \quad \vec{n} \begin{cases} \cos \gamma \cos \lambda \\ \cos \gamma \sin \lambda \\ \sin \gamma \end{cases} \quad / 19 /$$

/ 18 / és / 19 /-ből az \vec{s} y és z komponense:

$$\vec{s}_y = \cos \lambda \sin \varphi \cos \theta - \sin \gamma \sin \lambda \sin \varphi \sin \theta + \cos \gamma \sin \lambda \cos \varphi$$

/20/

$$\vec{s}_z = \cos \gamma \sin \varphi \sin \theta + \sin \gamma \cos \varphi$$



19. ábra. A számításokhoz használt marginális membrán vázolata. /Jelmagyarázat a szövegben./

λ -ra és θ -ra átlagolva

$$s_y^2 = I_{II} = 1/4 \sin^2 \varphi + 1/4 \overline{\sin^2 \gamma} \sin^2 \varphi + 1/2 \overline{\cos^2 \gamma} \cos^2 \varphi$$

/21/

$$s_z^2 = I_I = 1/2 \overline{\cos^2 \gamma} \sin^2 \varphi + \overline{\sin^2 \gamma} \cos^2 \varphi$$

mivel:

$$\overline{\sin^2 \gamma} = \overline{\cos^2 \gamma} = 1/2 \quad /22/$$

így:

$$FP = \frac{1 + 1/2 \sin^2 \varphi}{1 + \cos^2 \varphi} \quad /23/$$

Vegyük pl. azt az esetet, amikor a membránok 25%-a tekinthető marginálisnak, és hasonlítsuk össze azzal az esettel, amikor az összes membránt síknak tekintjük.

Tegyük fel, hogy $FP = 1,5$ értéket mértünk. Ha úgy vesszük, hogy a rendszerünk ideális sík membránokból áll, akkor /5/-ből:

$$FP = 1/2 \frac{\sin^2 \varphi}{\cos^2 \varphi} \quad \varphi = 60^\circ \quad \text{ha } FP = 1,5$$

Ha feltételezzük, hogy a membránok 25%-a marginális, akkor:

$$FP = \frac{a I_{\parallel} \text{ marginális} + b I_{\parallel} \text{ sík}}{a I_{\perp} \text{ marginális} + b I_{\perp} \text{ sík}} \quad /24/$$

ahol $a + b = 1$, azaz jelen esetben $a=0,25$, $b=0,75$

így /4/ és /21/ segítségével:

$$FP = \frac{/ 1 + 1/2 \sin^2 \varphi / 0,25 + / 1/2 \sin^2 \varphi / 0,75}{/ 1 + \cos^2 \varphi / 0,25 + / \cos^2 \varphi / 0,75}$$

$FP = 1,5$ esetén $\varphi = 64^\circ 20'$ -t és nem 60° -t mint amit a sík membrán esetére kaptunk.

Most nézzük meg a másik oldalról ugyanezt az esetet. Vegyük a $\varphi = 60^\circ$ -ot és nézzük, hogyan változik az FP értéke, ha a membránok 25%-át marginálisnak vesszük. Helyettesítsük be /27/-be $\varphi = 60^\circ$ -ot, ekkor az $FP = 1,25$, míg a sík membrán esetére láttuk, hogy $\varphi = 60^\circ$ -ra $FP = 1,5$.

Rendkívül érdekes az az eset, amikor a $\varphi = 90^\circ$ azaz a dipólvektor belesimul a síkba. Ekkor az "ideális" sík membránra /5/-ből:

$$\text{ha } \varphi \rightarrow 90^\circ \quad \text{akkor} \quad FP \rightarrow +\infty$$

Viszont, ha feltételezzük, hogy a membránok 1%-a marginális, akkor /25/-be $a = 0,01$ és $b = 0,99$ -et beírva:

$$\varphi = 90^\circ \quad \text{esetén} \quad FP = 51$$

ha pedig a membránok 25%-át veszem marginálisnak:

$$\varphi = 90^\circ \quad \text{esetén} \quad FP = 3$$

Azaz, ha a számításoknál figyelembe vesszük, hogy a membránok széle görbült, akkor az FP értéke a membránsíkba simuló dipólvektor esetén már korántsem ∞ , hanem egy véges és elegendően kicsiny pozitív szám. Megjegyezzük, hogy növekvő szféricitás mellett is rohamosan csökken az FP maximálisan mérhető értéke:

$$\varphi = 90^\circ \text{ esetén, } \begin{cases} \text{ha } \delta = 10^\circ, \text{ akkor } FP = 49,5 \\ \text{ha } \delta = 60^\circ, \text{ akkor } FP = 1,67 \end{cases}$$

3.4. A mágneses orientáció mértékének meghatározása

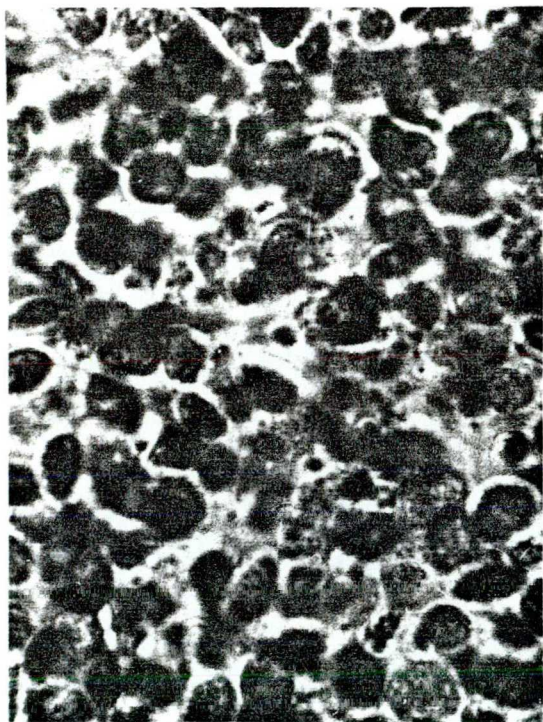
A mintából érkező fluoreszcencia intenzitás egy része polarizálatlan, azaz Ψ értékétől függetlenül a belőle eredő FP értéke 1,0-t ad. Az ilyen emisszió az eddig említett eseteken kívül eredhet:

a./ Plasztisztörmelékekből, amelyek nem képesek orientálódni.

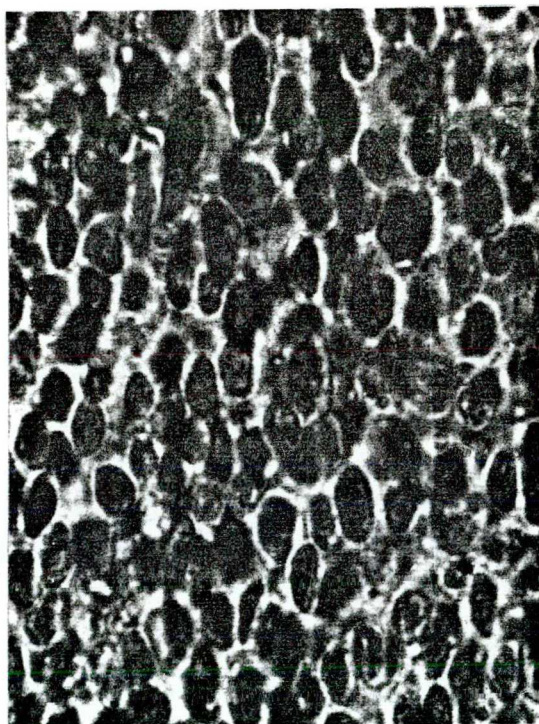
b./ Valamilyen okból nem orientálódott ép plasztiszokból.

a./ Az általunk használt izolálási módszer maga után vonja azt, hogy a homogenizáláskor a plasztiszok egy része összetörik, és ezen törmelékek egy hányada az ülepités és a felszuszpendálás után is benne marad a szuszpenzióban. Annak eldöntésére, hogy a kloroplasztisztörmelékek orientálódnak-e vagy sem a már kész szuszpenziót újra homogenizáltuk mindaddig, amíg a plasztiszokat tökéletesen össze nem törtük. Az összetöröttség mértékének ellenőrzését az újra és újra homogenizált szuszpenziókból vett minták fénymikroszkópos megfigyelésével /immerziós lencse, 1500 x-os nagyítás/ végeztük. A már összetörtnek ítélt plasztiszokból álló szuszpenzióknak pedig a 2.3.-ban leírt berendezéssel szobahőmérsékleten, 680 nm-es hullámhossznál megmértük a fluoreszcencia polarizációs hányadosát és összehasonlítottuk az összetörés előtt mért FP értékekkel. Az ép kloroplasztiszok polarizációs hányado-

sa $1,39 \pm 0,01$, a törmelékekkel mért FP értéke $1,03 \pm 0,01$ volt. Megállapítható tehát, hogy a kloroplasztisz-törmelékek az általunk használt mágneses térerősségben /14 kGauss/ nem orientálódnak. A mélyhőmérsékletű FP mérésekhez használt plasztiszszuszpenziókban jelenlévő plasztisztörmelékek százalékos arányát megbecsültük a törmelékek számlálásával fénymikroszkóp, Bürker-kamra és fényképfelvételek segítségével /immerziós lencse, 1500 x-os nagyítás/. Megállapítottuk, hogy az FP mérésekhez használt szuszpenziókban a törmelék plasztiszok hányada $15 \pm 7\%$ -nak vehető.



a.



b.

20. ábra. Kukorica mezofill kloroplasztiszuszpenzió fénymikroszkópos felvételei /immerziós lencse, 1500 x-os nagyítás/ a.: $H = 0$, b.: $H = 14$ kGauss

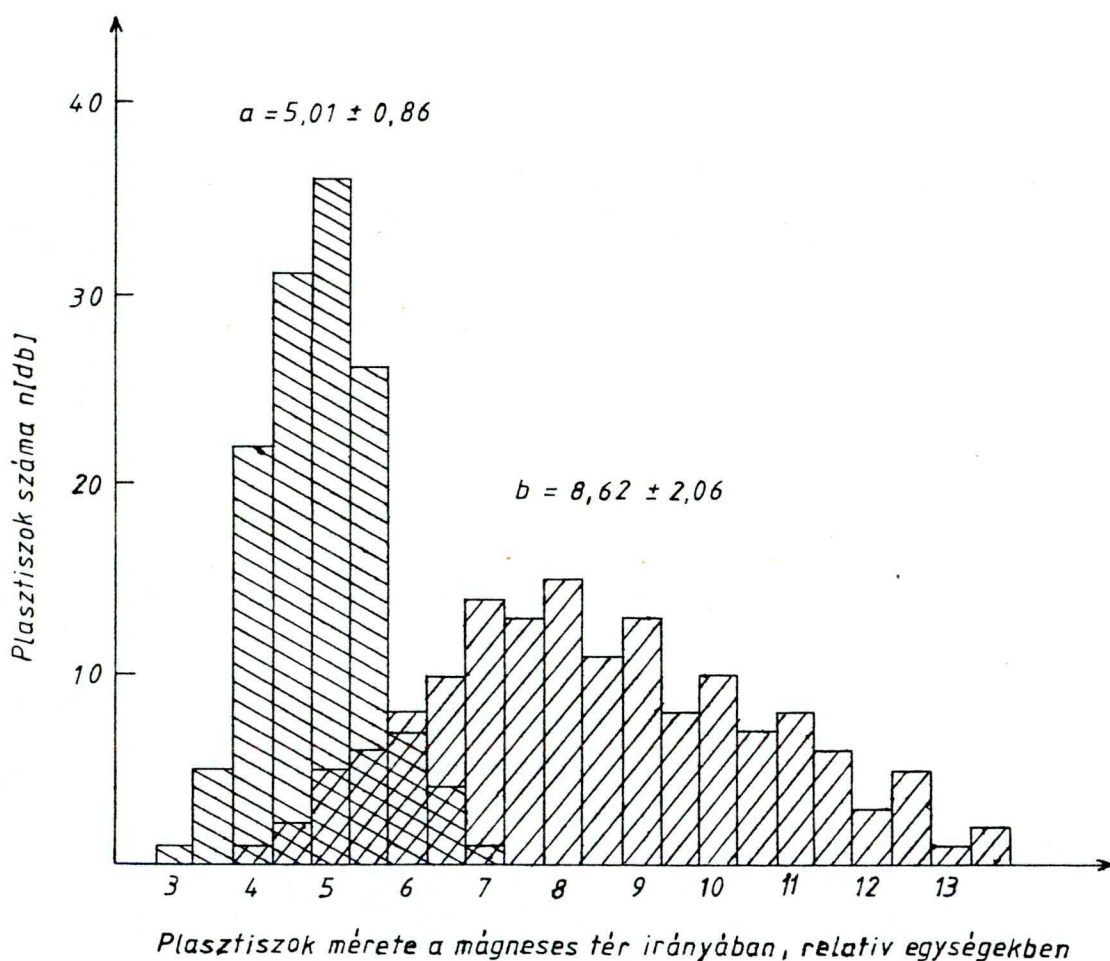
b./ Az ép plasztiszok orientálódásának százalékos arányát a mágneses térben készült fénymikroszkópos felvételek segítségével határoztuk meg /lásd, 2.5/. A 20. ábra jól szemlélteti a plasztiszok térbeli elhelyezkedését a mágneses tér bekapcsolása nélkül és a térben. A felvételeken jól megfigyelhető, hogy az orientálatlan plasztiszok nagy része "felülnézetben" látható, és az élükkel felénk forduló plasztiszoknál sincs kitüntetett irány /20.a. ábra/. A mágneses térben ugyanezek a plasztiszok élükkel felénk fordulnak, és jól meghatározott irányba - a mágneses tér irányára merőlegesen - rendeződnek /20.b. ábra/, ami jó egyezésben van az irodalomban a vizuálisan /110/, valamint a röntgen /111/ és neutronszórással /112/ kapott eredményekkel.

Az orientálódás mértékének statisztikus kiértékeléséhez hisztogramot készítettünk /21. ábra/. A kloroplasztiszok maximális átmérőjét a fényképfelvételekről a mágneses tér irányába mértük, s ezt ábrázoltuk a hisztogramon. Az ábrázolt értékeket a kinagyított felvételeken mm-ben mértük.

Megfigyeltük, hogy az ép plasztiszok egy része sem tud orientálódni a mágneses térben. Vizsgálataink szerint ennek a tökéletlen orientálódásnak az oka is az izolálási módszerben keresendő. A 22. ábrán jól látható, hogy a plasztiszok egy csoportját egy citoplazma darab tartja össze, ezért nem képesek orientálódni.

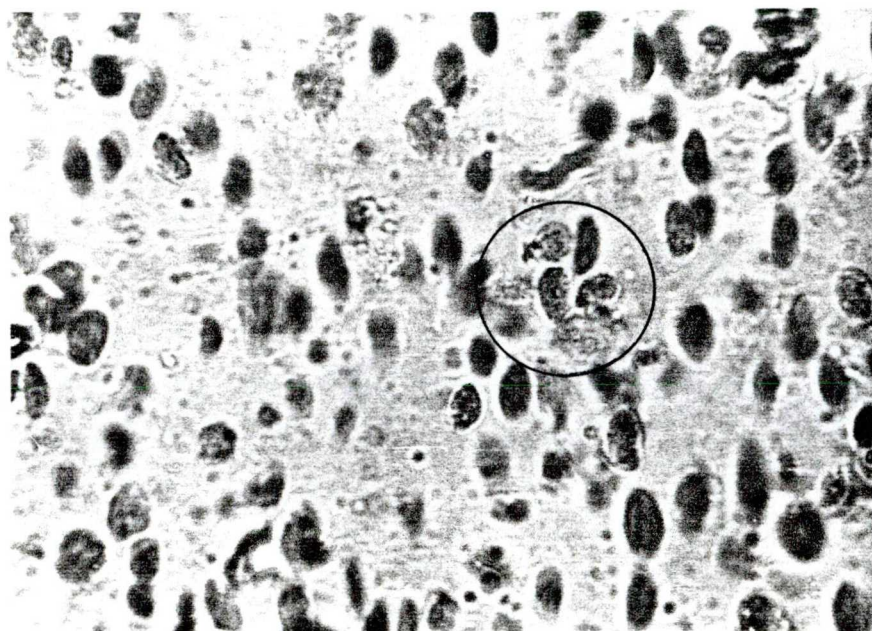


Amint azt a törmelék plasztiszok vizsgálata és a nem orientálódó egész plasztiszokra vonatkozó megfigyeléseink is bizonyítják az izolálási módszer lényegesen befolyásolja a megfelelő vizsgálati anyag előállítását.



21. ábra. Hisztogram, a plasztiszok mágneses tér irányába eső maximális átmérőjének eloszlása, $H = 0$ /a/ és $H = 14$ kGauss /b/ térerősség mellett.

Mindez - orientációs vizsgálatoknál különösen - szükségessé teszi az izolálási folyamat nagyon precíz és elő-

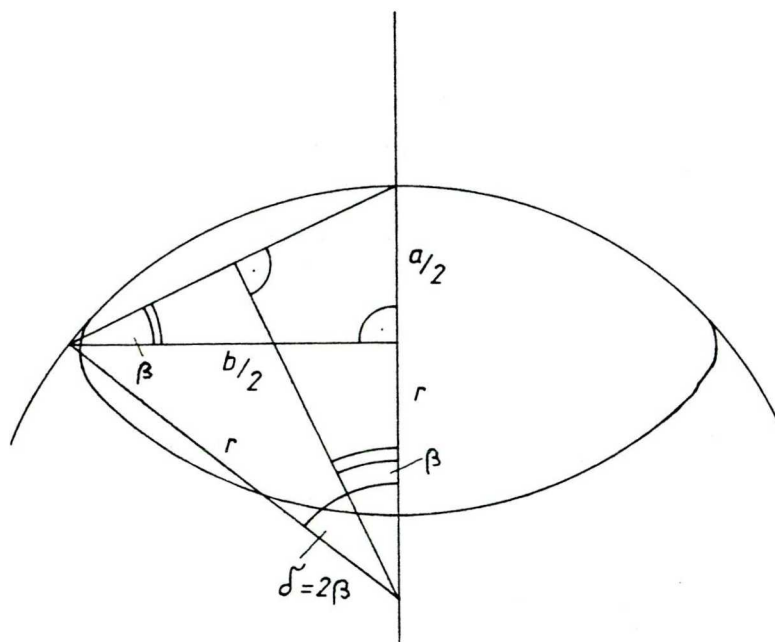


22. ábra. Mágneses térrel orientált kukorica mezofill kloroplasztiszok fénymikroszkópos felvétele /immerziós lencse, 1500 x-os nagyítás/. A felvételen a citoplazmához tapadt plasztisz-csoportot a körrel határolt részben találjuk.

vigyázatos végrehajtását. A nem orientálódott ép plasztiszok százalékos arányát az izoláló módszer finomításával /leülepités előtt 2-szeri "lecsapatás"/ $10 \pm 5\%$ -ra tudtuk beállítani. Ez utóbbi eredményt 45 különböző orientált mintáról készített fényképfelvétel kiértékelése alapján becsültük meg, és az FP mérésekhez ilyen szuszpenziókat használtunk.

3.5. A "szféricitás" paraméterének meghatározása

Vegyük a hisztogramon szereplő két maximum értéket a nekik megfelelő félértékszélességgel, és tekintsük ezeket



23. ábra. Vázlat a "szféricitás" paraméterének meghatározásához a hisztogramból kapott értékek alapján.

úgy mint a lencse alakú kloroplasztisz keresztmetszetének két főtengelymérete /23. ábra/, így egy közelítő értéket kaphatunk δ -ra, a "szféricitás" paraméterére.

Az ábrából:

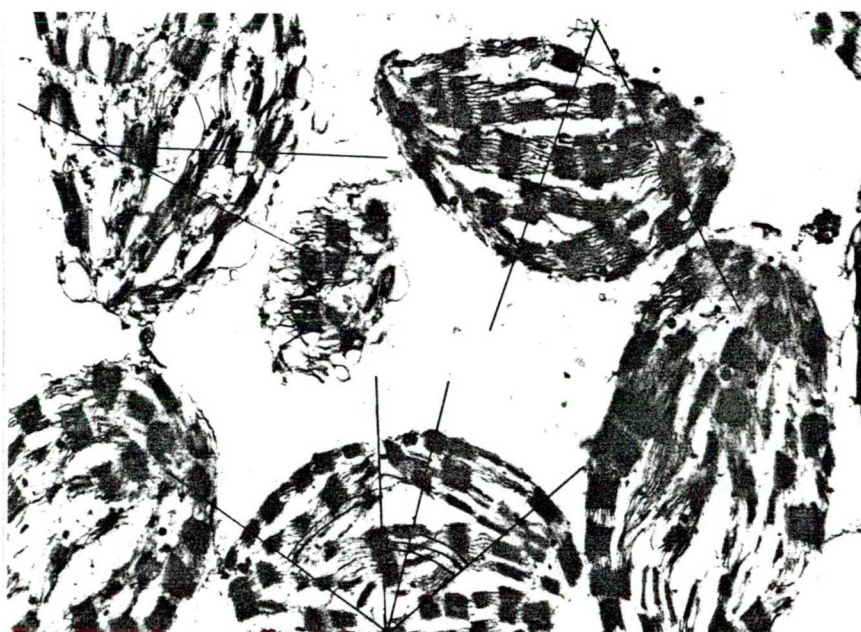
$$\beta = \arctg \frac{a}{b} \quad /25/$$

$$\delta = 2\beta = 2 \arctg \frac{a \pm \sigma_a}{b \pm \sigma_b} \quad /26/$$

ebből 21. és 23. ábra valamint /26/ segítségével kapjuk, hogy:

$$\delta \approx 60^\circ \pm 15^\circ$$

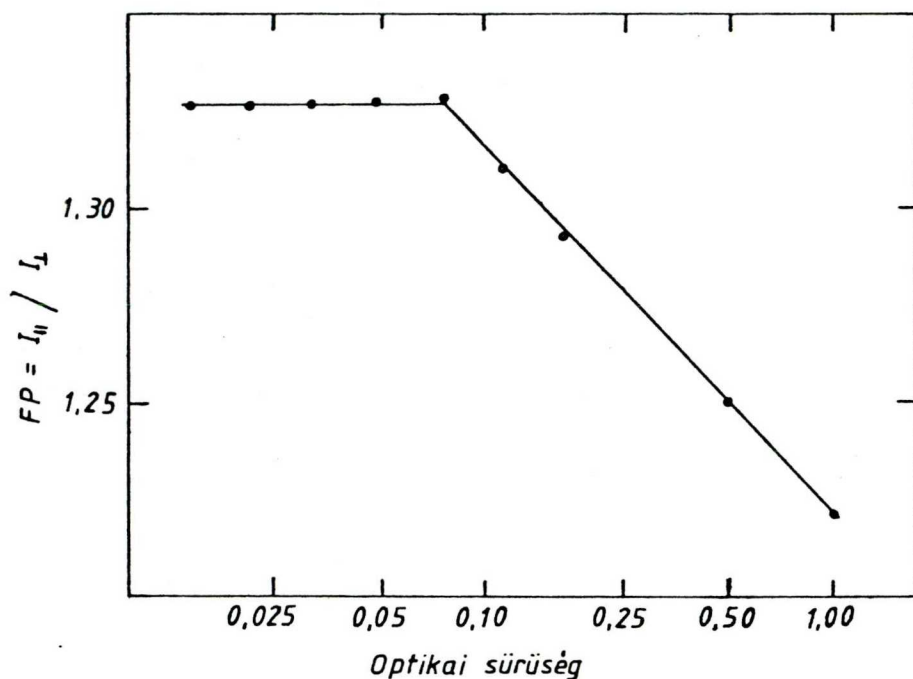
A hisztogramból kapott eredmény jó egyezésben van az izolált kloroplasztiszok elektronmikroszkópos vizsgálata alapján kapott eredményekkel /24. ábra/.



24. ábra. Kukorica kloroplasztiszok elektronmikroszkópos felvételei. A β értékét a kihuzott vonalak által bezárt szög adja.

3.6. Az FP koncentráció függése

Annak eldöntésére, hogy milyen koncentrációju plasztiszszuszpenzió felel meg legjobban az FP méréseknek, meghatároztuk az FP koncentráció függését 680 nm-nél szobahőmérsékleten /25. ábra/.



25. ábra. Az FP-nek a plasztiszkoncentrációtól való függése. /Az optikai sűrűséget 1 mm-es rétegvastagságnál mértük./

A méréseknél 66% glicerint tartalmazó szuszpenziókat használtunk. Az ábrán nagyon jól látszik, hogy a koncentráció növekedésével az FP értéke csökken. Az FP értékének csökkenését a koncentráció növekedésével a reabszorpciónak és a fényszórásnak tulajdoníthatjuk.

Fluoreszcencia polarizáció mérésekhez a kloroplasztisz szuszpenzió optikai sűrűségét a vörös abszorpciós maximumon 0,05 körüli értékre állítottuk.

3.7. A glicerín hatása

Megvizsgáltuk, hogy a mélyhőmérsékletű FP mérésekhez használt szuszpenziókban lévő 66%-os glicerín valamilyen módon változtat-e az FP értékén a glicerint nem tartalmazóhoz viszonyítva. A méréseket a 2.8.-ban leírt berendezéssel végeztük szobahőmérsékleten 680 nm-nél 66% glicerint tartalmazó és glicerín-mentes szuszpenziókkal /a két szuszpenzió klorofilltartalma megegyezett/. A mért FP értékekből / $1,38 \pm 0,01$ ill. $1,31 \pm 0,01$ / kitűnik, hogy a glicerín az FP értékét számottevően csökkenti.

Az FP értékére kapott eredmények azt valószínűsítik, hogy a glicerinnak van valami olyan hatása a plasztiszok membránrendszerére, ami például a membránok kilazulását, szétzilálódását eredményezi, s ezáltal az orientálatlan hányad valamint a szféricitás növekedése okozhatja az FP értékek csökkenését. A feltevésünk igazolására elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztünk a 66%-os glicerint és a glicerint nem tartalmazó plasztiszuszuszpenziókkal. Az eredményt a 26. ábrán szemléltetjük.

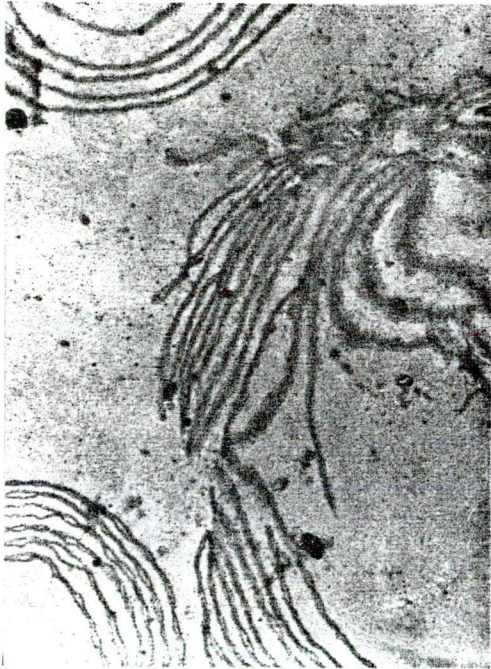
Érdemes megfigyelni, hogy a hüvelyparenchima kloroplasztiszok membránjai glicerínben teljesen kigömbölyödnek, ezért szinte egyáltalán nem orientálódnak /26.c.ábra/.



a.



b.



c.



d.

26. ábra. Izolált kukorica kloroplasztiszok elektron-
mikroszkópos felvételei, glicerín nélkül /a./,
és glicerínben /b., c., d./.

3.8. Az FP értékek korrekciójának elmélete a reális membránstruktúra és a nem tökéletes orientáció figyelembevételével

Vezessük be a következő jelöléseket:

a: a nem orientált ép plasztiszok és a törmelék együttes hányada,

b: a marginális részek hányada,

c_0 } a különböző σ_i szféricitású membránok hányada,
• } ahol a c_0 -hoz a $\sigma_0 = 0$ tartozik, azaz a sík membránok
• } hányada.
 c_k

Legyen még: $a + b + \sum_{i=0}^k c_i = 1$ /27/

Az FP definíciójából:

$$FP = \frac{I_{\parallel}^{\ddot{o}}}{I_{\perp}^{\ddot{o}}} = \frac{I_{\parallel}^{no} + I_{\parallel}^{mg} + I_{\parallel}^{szf}}{I_{\perp}^{no} + I_{\perp}^{mg} + I_{\perp}^{szf}} \quad /28/$$

ahol: $I^{\ddot{o}}$: az összes,

I^{no} : az orientálatlan kloroplasztiszokból /és a törmelékből/,

I^{mg} : a marginális részekből,

I^{szf} : a különböző szféricitású membránokból eredő fluoreszcencia intenzitás.

Az /5/, /11/, /21/ és /22/ összefüggések figyelembevételével, átrendezés után :

$$I_{II}^{\ddot{o}} = \sin^2 \psi \left(\frac{1}{8}b + \frac{3}{4} \sum_{i=0}^k c_i t_i - \frac{1}{4} \sum_{i=0}^k c_i \right) + \\ + \left(\frac{1}{3}a + \frac{1}{2}b - \frac{1}{2} \sum_{i=0}^k c_i t_i + \frac{1}{2} \sum_{i=0}^k c_i \right)$$

és

/29/

$$I_{I}^{\ddot{o}} = \sin^2 \psi \left(-\frac{1}{4}b - \frac{3}{2} \sum_{i=0}^k c_i t_i + \frac{1}{2} \sum_{i=0}^k c_i \right) + \\ + \left(\frac{1}{3}a + \frac{1}{2}b + \sum_{i=0}^k c_i t_i \right)$$

ahol: $t_i = \frac{1}{3} (1 + \cos \delta_i + \cos^2 \delta_i)$

Vezessük be a következő jelöléseket:

$$A = \frac{1}{8}b + \frac{3}{4} \sum_{i=0}^k c_i t_i - \frac{1}{4} \sum_{i=0}^k c_i \quad /30/$$

$$B = \frac{1}{3}a + \frac{1}{4}b - \frac{1}{2} \sum_{i=0}^k c_i t_i + \frac{1}{2} \sum_{i=0}^k c_i \quad /31/$$

$$- C = -\frac{1}{4}b - \frac{3}{2} \sum_{i=0}^k c_i t_i + \frac{1}{2} \sum_{i=0}^k c_i \quad /32/$$



$$D = \frac{1}{3}a + \frac{1}{2}b + \sum_{i=0}^k c_i t_i \quad /33/$$

Igy:

$$\begin{aligned} I_{||}'' &= A \sin^2 \varphi + B \\ I_{\perp}'' &= D - C \sin^2 \varphi \end{aligned} \quad /34/$$

Ezeket /28/-ba beírva:

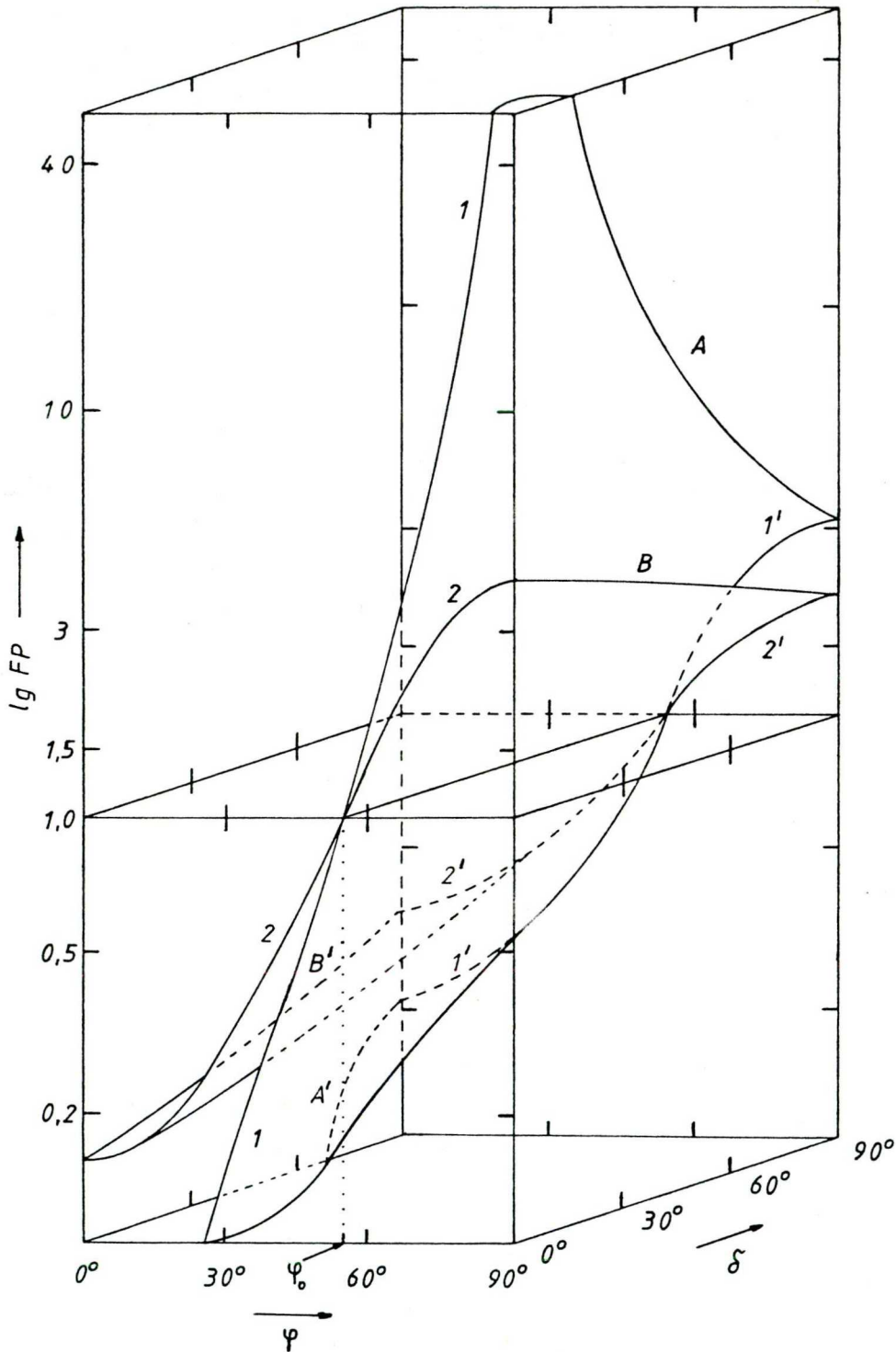
$$FP = \frac{A \sin^2 \varphi + B}{D - \sin^2 \varphi} \quad /35/$$

Amelyből:

$$\varphi = \arcsin \frac{FP D - B}{A + FP C} \quad /36/$$

Itt FP a fluoreszcencia polarizációs hányados mért értékét jelenti, A,B,C,D, pedig kiszámíthatók az általunk megadott paraméterekből.

A 27. ábrán azt szemléltetjük, hogy milyen módon befolyásolják az FP és a φ értékét a korrekciós számításnál használt a, b, c_i , σ_i paraméterek. Az ábrán a függőleges tengelyen az FP logaritmusát ábrázoltuk φ és σ függvényében. A lg FP, φ sikon / $\delta=0$, $a=0$, $b=0$ / az 1-gyel jelölt görbe mutatja az FP és a φ közötti összefüggést ideális sík membrán esetén /lásd /5/ egyenlet/.



27. ábra. $\lg FP$ értékének ψ -től és δ -től való függése. /Jelmagyarázat a szövegben./ Az 1, A, 1', A' és a 2, B, 2', B' felületek hasábjában való elhelyezkedését külön nem jelzett szakaszokkal szemléltetjük.

Ekkor $\varphi \in [0^\circ, 90^\circ]$ esetén $FP \in [0, \infty]$ és a mágikus szög-
nél $\varphi = \varphi_0 = 54^\circ 34'$ / FP értéke 1,0. Tökéletes orientá-
ciót feltételezve $a=0$ / és eltekintve a marginális ré-
szekből eredő fluoreszcenciától $b=0$ /, olyan kloroplasz-
tiszokkal, amelyekben $\delta = 90^\circ$ -os membránokat is találunk,
FP értéke 0,22 és 3,2 között változik, ha $\varphi \in [0^\circ, 90^\circ]$ /1'-
-vel jelzett görbe/. (Amikor $\delta \neq 0$, a számításoknál feltéte-
leztük, hogy a kloroplasztisz membránjainak szféricitása
0 és δ között változik. A számítások egyszerűsítése vé-
gett $c_0 = c_1 = \dots = c_k$ azonos súlyozásokkal vettük figye-
lembe a 0° ; 10° ; \dots ; $10k^\circ = \delta$ szféricitásu membránok-
ból eredő fluoreszcenciát.)

A ill. A' görbék különböző δ értékekre a mérhető FP
nagyságát adják meg $\varphi = 0^\circ$ ill. $\varphi = 90^\circ$ esetére.

Az 1, A, 1', A' görbék által határolt felület az $FP=1,0$
síkot a $\varphi = \varphi_0$ egyenesben metszi. Ha tehát a dipólok a memb-
rán normálisával φ_0 szöget zárnak be, FP értékére a
szféricitástól függetlenül - ugyanugy, mint az "ideális"
sík membránoknál - 1,0 értéket kapunk.

A 27. ábra 2 ill. 2' görbéi az FP φ -től való függését
mutatják $a=b=0,2$ esetén, azaz ha a nem orientálódó plasztiszokból és a törmelékből valamint az orientált membránokból 20-20%-os járulékot veszünk figyelembe. B és B' görbék - a és b ugyanezen értékeivel - a különböző szféricitásu membránoknál mérhető FP maximális $\varphi=90^\circ$ / és minimálisan $\varphi=0^\circ$ / értékét adják meg.

Az $a, b \neq 0$ -hoz tartozó felületek is a mágikus szög $\varphi = \varphi_0$ egyenesében metszik az $FP=1$ síkot. A mágikus szög értéke tehát az a, b, c_i, δ_i paraméterek értékétől független.

A 27. ábra azt is szemlélteti, hogy orientált kloroplasztiszok polarizáció hányados méréseinél kapott értékek viszonylag szűk intervallumban mozoghatnak. Másrészt a kapott FP /és általában a polarizáció hányados/ értékek ugyanazon φ mellett is erősen függenek a kloroplasztisz membránszerkezetétől és az orientálódás mértékétől.

3.9. A különböző emissziós dipólokhoz tartozó FP értékek becslése a fluoreszcencia sávok különválasztása segítségével

Az FP spektrumokból általában olyan emissziós dipólok membránsikkal bezárt szögét becsülhetjük meg jó közelítéssel, amelyekhez tartozó sávok viszonylag "tiszták". Az emissziós sávok átfedése esetén a mért FP értékek a résztvevő sávok FP értékeinek intenzitásaik arányában súlyozott átlaga.

Kloroplasztiszok mélyhőmérsékletű spektrumaiban a 685 és a 735 nm-nél jelentkező sávok igen erősek az emisszióban résztvevő többi sávhoz képest. Ennek megfelelően a 680 és 690 nm ill. a 730 és 750 nm között mért FP értéke konstans és jó közelítéssel az F 685-höz ill az F 735-höz tartozó emissziós dipólok orientációjára ad felvilágosítást /80/.

660 és 680 nm ill. 690 és 730 nm között a mért FP értékekből közvetlenül csak arra következtethetünk, hogy az itt emittáló dipólok a membrán normálisával kisebb szöget zárnak be, mint az őket erősen átfedő domináló sávokhoz tartozó dipólok.

A jelenlévő kisebb sávok dipóljai orientációjának pontosabb becslésére közelítő számításokat kell elvégezni.

Közelítsük az emissziós sávokat hullámhossz szerinti normális eloszlással. A Gauss-féle görbét a következő függvénnyel adhatjuk meg:

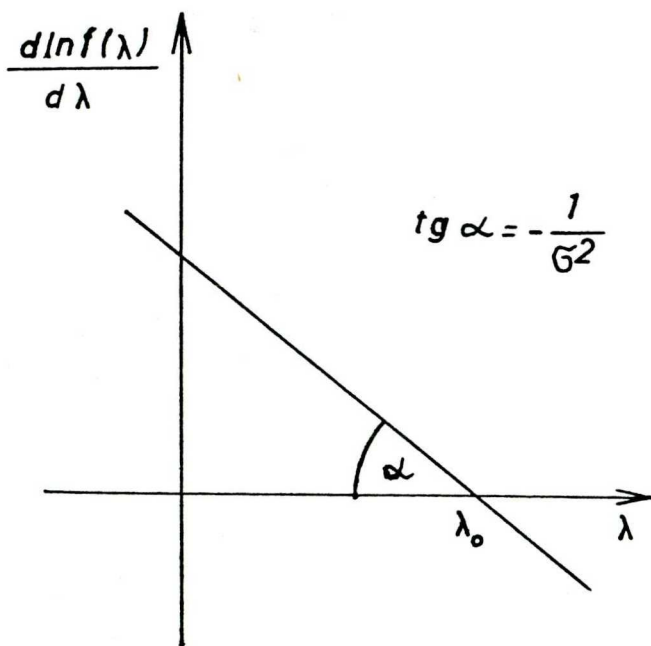
$$f / \lambda / = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(\lambda - \lambda_0)^2}{2\sigma^2}} \quad /37/$$

Ennek a függvénynek a természetes alapu logaritmusát λ szerint differenciálva és átrendezve:

$$\frac{d \ln f / \lambda /}{d \lambda} = \frac{-1}{\sigma^2} \lambda + \frac{1}{\sigma^2} \lambda_0 \quad /38/$$

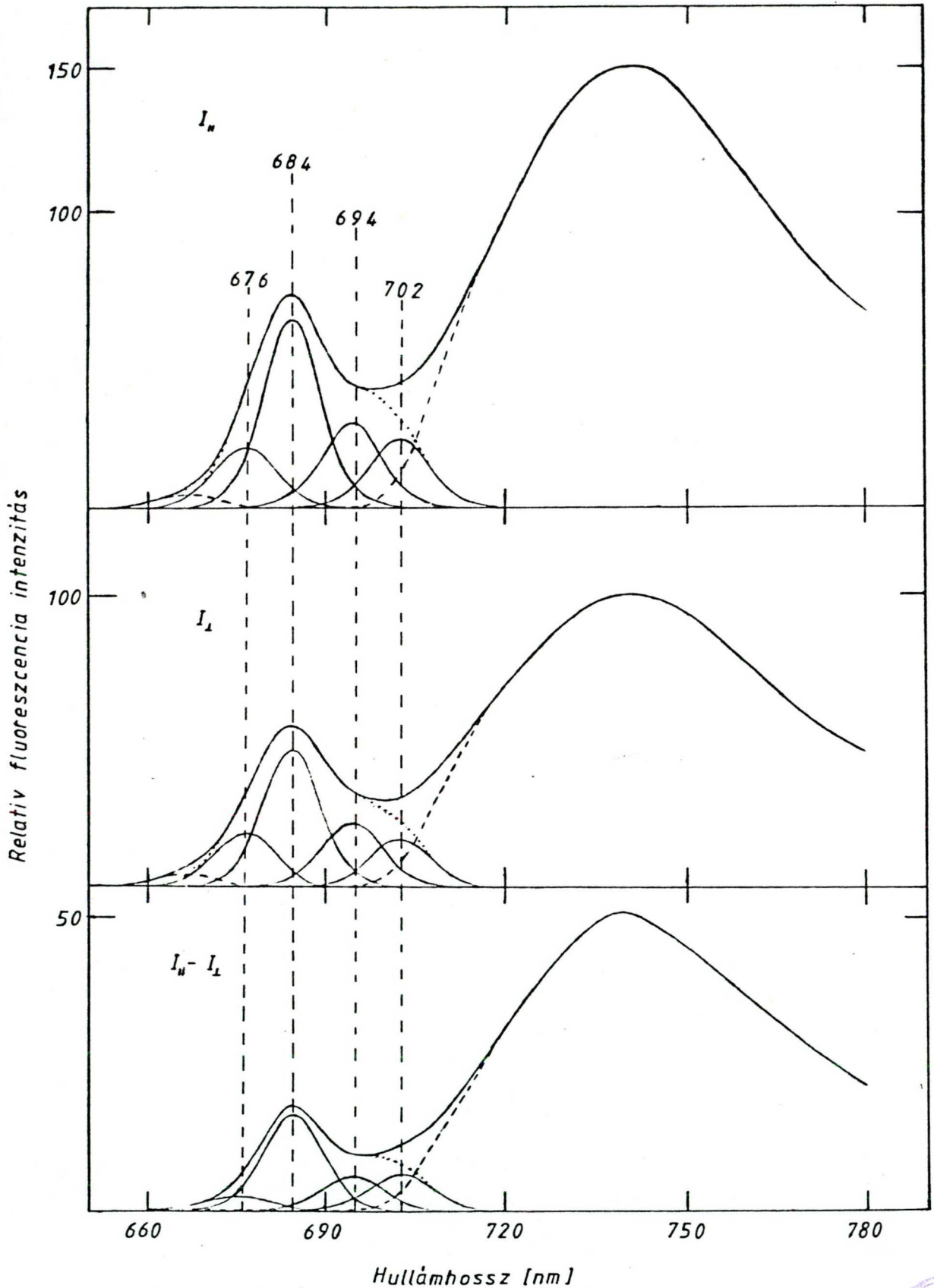
Ez utóbbi egy olyan egyenesnek az egyenlete, amely a hullámhossztengelyt a Gauss görbe maximumhelyénél $/\lambda_0/$ metszi, az egyenes iránytangense pedig a σ^2 reciproka /28. ábra/. Ezen megfontolások alapján a mélyhőmérsékletű $-120^\circ\text{C}/$ polarizált fluoreszcencia spektrumok rövidebb hullámhosszu részéből lebontottuk az F 685-nek megfelelő Gauss-féle görbét. Ezen megfontolás alapját az képezte, hogy az F 685-ös forma a maximum hely közelében

csaknem tisztán átfedések nélkül van jelen, s a spektrum-
ban lévő sávok tisztaságát ebben a tartományban még a vib-
rációs átmenetek sem zavarják.



28. ábra. Egy Gauss-eloszlású fluoreszcencia sáv
Gauss-egyenese.

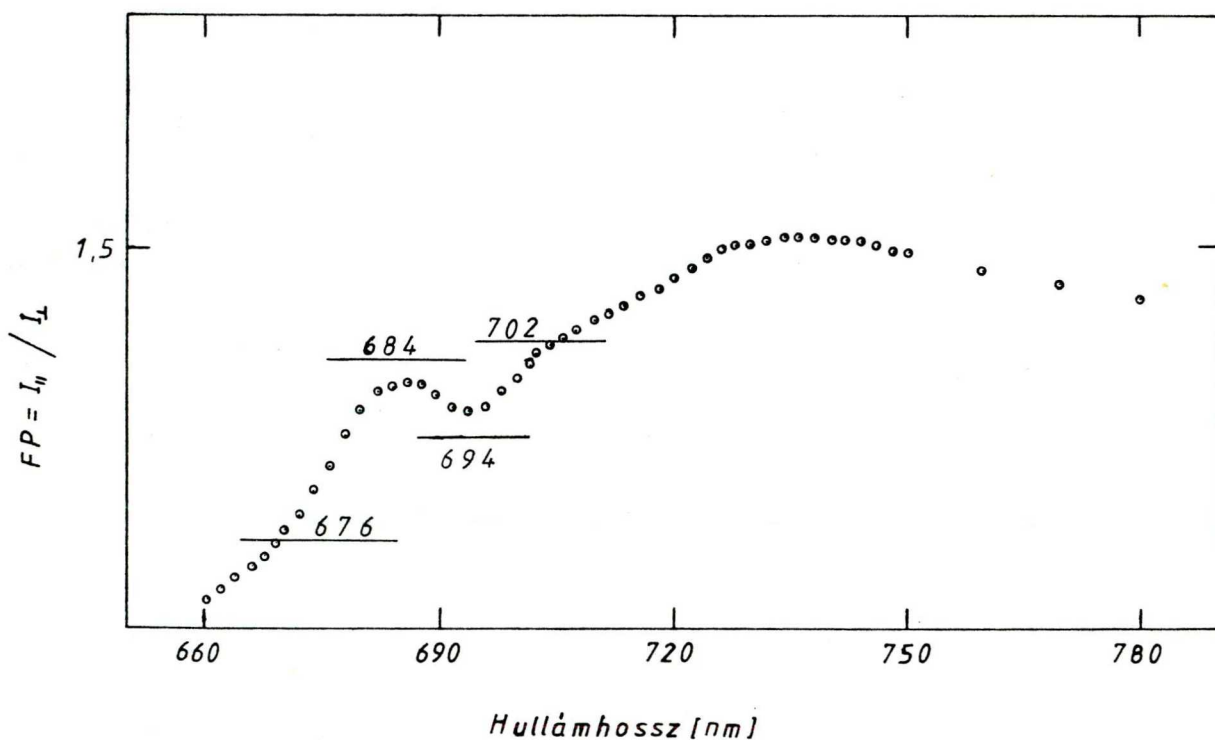
Mintegy 25 db spektrum vizsgálata alapján az F 685-ös
forma maximumhelye 684 nm-nek adódott az egyenes irány-
tangenséből a sávok félértékszélességére 12 nm-t kaptunk.
Ezen sávot lebontva a fluoreszcencia spektrumokból, a ma-
radékban nagyon jól megfigyelhetővé vált az emisszió rö-
videbb hullámhosszu tartományának összetettsége. Észreve-
hetővé vált az F 675 és a maradékban erős sávként jelent-



29. ábra. Mágneses térben orientált kloroplasztiszok mély-



hőmérsékletű -120°C fluoreszcenciájának membránsikkal párhuzamos I_{\parallel} és arra merőleges I_{\perp} összetevőinek, valamint a kettő különbségének $I_{\parallel} - I_{\perp}$ spektruma és sávszerkezete 660-710 nm között.



30. ábra. Kukorica mezofill kloroplasztiszok mélyhőmérsékletű -120°C fluoreszcencia polarizációs hányados spektruma. Az egyenes szakaszok az egyes lebontott sávokhoz tartozó FP értékek.

kezett az F 695. A maradék spektrumokra alkalmazva a fentebb említett eljárást az F 675 maximumhelyére 676 nm, az F 695-re pedig 694 nm adódott, s a sávok félértékszélességére ugyancsak 12 nm. Az F 695 lebontása után egy jól kivehető váll utalt az F 702 jelenlétére. A lebon-

tott sáv maximumhelyére 702 nm, félértékszélességére, az előbbiekhez hasonlóan, 12 nm adódott. A sávok intenzitásának értékét iterációval határoztuk meg. A spektrumok sávokra bontását elvégeztük a fluoreszcencia membránsikkal párhuzamos I_{\parallel} és arra merőleges I_{\perp} összetevőjére és a fluoreszcencia polarizációs különbségi spektrumokra is /29. ábra/. Az I_{\parallel} és I_{\perp} spektrumok sávjainak hányadosa közelítő értéket szolgáltat a megfelelő sáv fluoreszcencia polarizációs hányadosára.

Megjegyzendő, hogy az ilyen típusu bontással az emissziós spektrumban a hosszabb hullámhosszu tartományban lévő formák mér nem választhatók külön, mert a vibrációs nivók okozta bizonytalanság miatt az értékeket csak nagy hibával adhatnánk meg.

4. M E G V I T A T Á S

Az LD vizsgálatok alapján Becker és mts-i /90/ valamint Breton és mts-i /85/ arra a következtetésre jutottak, hogy a klorofillok vörös abszorpciós dipóljai 30° körüli szöget zárnak be a fotoszintetikus membrán síkjával. A legrövidebb és a leghosszabb hullámhosszu klorofill formának megfelelő vörös abszorpciós dipólok szögeltérését 5° -nál kisebbnek becsülték. Ezen vizsgálatokkal egyrészt az abszorpciós sávok nagy átfedése miatt több klorofill forma átlagos dipólszögét tudták csak megadni, másrészt számításaiknál ideálisan sík membránrendszert és tökéletes orientációt tételeztek fel.

A Garab és Breton által kidolgozott /80/ mérő módszer, a mélyhőmérsékletű FP spektrumok segítségével lehetőség nyílt arra, hogy az egyes fluoreszkáló klorofill-a formának megfelelő emissziós dipólok membránsíkkal bezárt szögét is megbecsüljük.

Ahhoz azonban, hogy a dipólok membránsíkkal bezárt szögét pontosabban megadjuk, szükség volt arra, hogy ne az eddigi vizsgálatoknál használatos ideális membránszerkezetet, hanem a kloroplasztiszok reális membránstrukturáját vegyük figyelembe.

Az elvégzett számítások azt mutatják, hogy figyelembe véve a plasztiszszuszpenzió azon jellemzőit, amelyek a kloroplasztiszok orientálódásának mértékét határozzák meg

valamint számításba véve a kloroplasztisz elektronmikroszkópos szerkezetéből adódó korrekciókat a valódi /belső/ FP értékek a mért FP értékektől lényegesen eltérnek /lásd 27. ábra/.

Reális körülmények között-a kloroplasztisz szuszpenzió 80-90%-os hatásfoku orientálódása mellett, átlagosan szférikus kloroplasztiszokat figyelembe véve / $\delta \approx 60^\circ$ / és 20%-nyi marginális membránfelülettel - FP maximális értékére / $\varphi = 90^\circ$ / 2 és 3 közötti értéket kapunk, szemben az ideális esetre kapott $+\infty$ helyett. Ez arra utal, hogy az abszorpciós és emissziós dipólok lényegesen jobban besimulnak a membránsíkba, mint azt az eddigiekben feltételezték /85,90/.

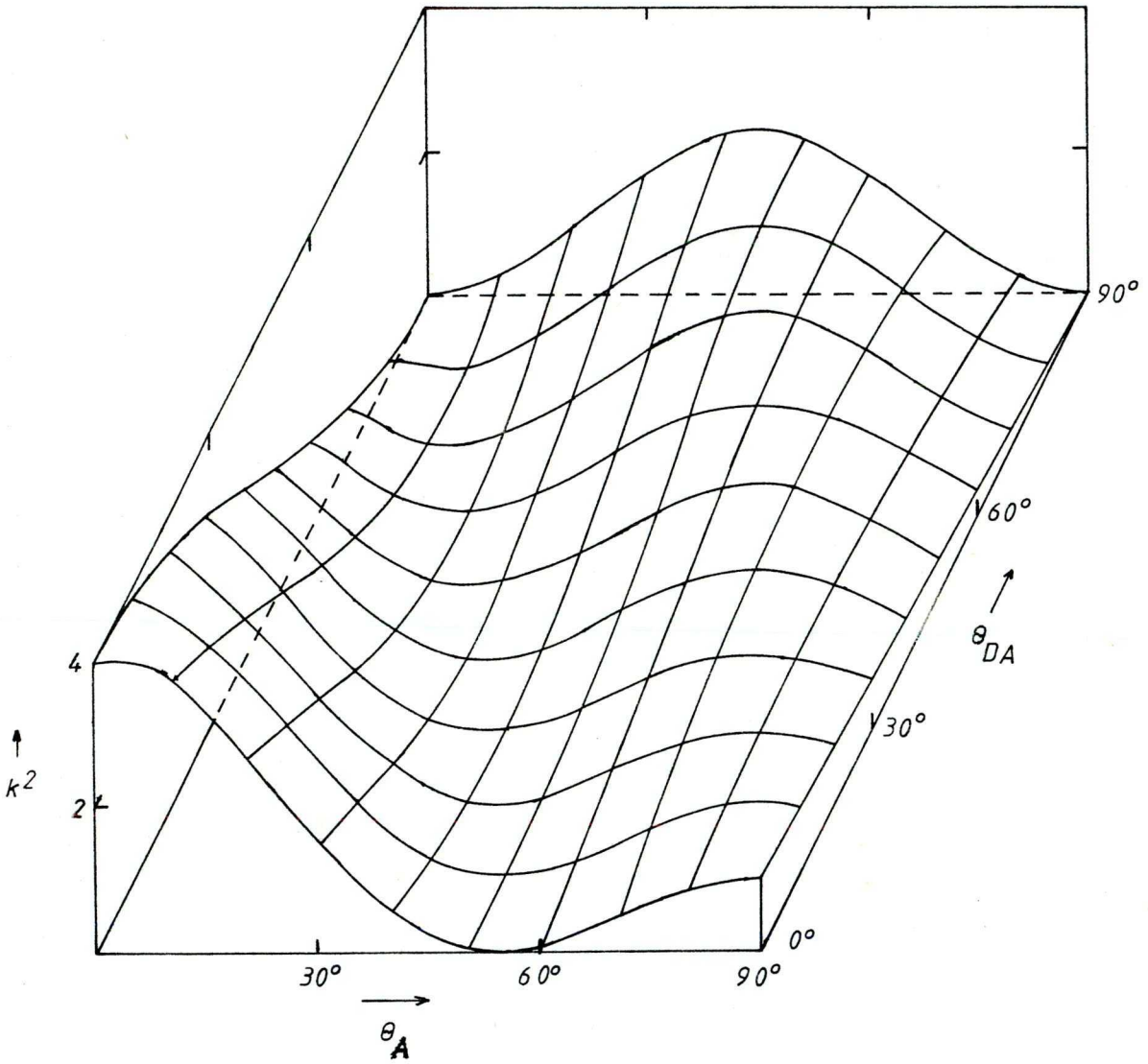
P-700 méréseknél kapott 2,5 körüli polarizációs hányados érték /115, 116/ azt valószínűsíti, hogy a P-700 megfelelő átmeneti dipólja jól besimul a membránba. /Ideális sík membránnal számolva a membrán síkjához viszonyítva 25° körüli értéket kapnánk./

Az FP és az FD spektrumok analizise alapján /12. és 30. ábra/ hat különböző emissziós dipól jelenlétére következtettünk. Ez jó egyezésben van az irodalomban található eredményekkel /80,117/. Közelítő számításokat végeztünk ezen sávok FP értékeinek meghatározására. Reális membránstrukturát és orientációt figyelembe véve az egyes emissziós dipólokra az alábbi közelítő értékek adhatók:

Q_{γ}^i	bontásból számított FP	korrekciók figyelembe- vételével a membrán sik- jával bezárt szög
F 676	1,10	32°
F 684	1,35	24°
F 694	1,25	29°
F 702	1,38	22°
F 720	1,45	20°
F 735	1,51	18°

Látható tehát, hogy egyrészt a dipólok jobban belesimulnak a membrán síkjába, mint azt eddig feltételezték. Másrészt pedig szélesebb szögintervallumot foglalnak el.

A 31. ábrán az orientációs faktor négyzetének Θ_A -tól és Θ_{DA} -tól való függését ábrázoltuk /v.ö. 6. ábra/. Az ábra alapján megállapítható, hogy az eddig megadott értékekhez viszonyítva az általunk megadott szögeloszlás esetén az energiaátadás hatásfoka kedvezőbb.



31. ábra. Az orientációs faktor négyzetének θ_A -tól és θ_{DA} -tól való függése.

5. Ö S S Z E F O G L A L Á S

Mágneses térben orientált izolált kloroplasztiszok fluoreszcencia polarizációját vizsgáltuk -120°C -on. Az irodalomban "ideális" sík membránokra kidolgozott számítási eljárást továbbfejlesztettük úgy, hogy azok a kloroplaszt struktúra és az orientáció reális viszonyainak megfeleljenek.

A fluoreszcencia polarizációs hányados /FP/ és különbségi spektrumok analizise alapján hat emissziós sávot különítettünk el, és az egyes sávok FP értékeit közelítő számításokkal meghatároztuk. Az egyes emissziós dipólokra kapott FP értékeket a kloroplasztiszok elektronmikroszkópos strukturáját valamint a szuszpenzió orientálódásának mértékét figyelembe véve megállapítottuk, hogy a különböző emissziós dipólok nagyobb szögintervallumot töltenek ki és beljebb simulnak a fotoszintetikus membránba, mint azt az eddigi irodalmi adatok megadták. Az általunk megadott szögeloszlást figyelembe véve az energiaátadás számított hatásfokára magasabb értékeket kaphatunk.

K Ö S Z Ö N E T N Y I L V Á N I T Á S

E helyen fejezem ki köszönetemet Farkas Gábor igazgató urnak, hogy lehetővé tette számomra a disszertáció elkészítését az Intézetben.

Ezuton mondok köszönetet témavezetőmnek Garab Győzőnek, valamint Faludi-Dániel Ágnesnek, Michel Michel-Villaznak és Mustárdy Lászlónak a munka során nyújtott állandó készséges segítségükért. Köszönettel tartozom Tóth Zsuzsannának technikai segítségéért.

Külön köszönettel tartozom Kétskeméty István professzor urnak, hogy az orientáció mérésekhez szükséges elektromágnesset rendelkezésünkre bocsátotta.

I R O D A L O M J E G Y Z É K

1. Van Niel, C.B. 1941. The bacterial photosynthesis and their importance for the general problem of photosynthesis. *Adv. Enzymol.* 1: 263-328.
2. Van Niel, C.B. 1962. The present status of the comparative study of photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 13: 1-26.
3. Clayton, R.K. 1965. "Molecular Physics in Photosyntheses", Blaisdell Publishing Co., New York -Toronto- London.
4. Emerson, R. and Arnold, W. 1932. The photochemical reaction in photosynthesis. *J. Gen. Physiol.* 16: 191-207.
5. Emerson, R. 1958. The quantum yield of photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 9: 1-24.
6. Paillotin, G. 1974. Etude theorique des modes de creation, de transport et d'utilisation de l'energie d'excitation electronique chez les plantes superieures. These, Univ. Paris-sud, Orsay
7. Knox, R.S. 1975. Excitation energy transfer and migration: theoretical considerations. In "Bioenergetics of Photosynthesis", edited by Govindjee, Academic Press, New York - San Francisco - London, pp. 183-221.
8. Knox, R.S. 1977. Photosynthetic efficiency and exciton

- transfer and trapping. In "Primary Processes of Photosynthesis", edited by Barber, J., Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam -New York - London. pp. 55-98.
9. Vernon, L.P. and Ke, B. 1966. Photochemistry of Chlorophyll in vivo. In "The Chlorophylls", edited by Vernon, L.P. and Seely, G.R., Academic Press, New York - London, pp. 596-610.
 10. Sauer, K. 1975. Primary events and the trapping of energy. In "Bioenergetics of Photosynthesis", edited by Govindjee, Academic Press, New York - San Francisco - London, pp. 115-181.
 11. Trebst, A. 1974. Energy conservation in photosynthetic electron transport of chloroplasts. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 423-458.
 12. Avron, M. 1975. The electron transport chain in chloroplasts. In "Bioenergetics of Photosynthesis", edited by Govindjee, Academic Press, New York - San Francisco - London, pp. 373-386.
 13. Mitchell, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* 191: 145-148.
 14. Witt, H.T. 1979. Energy conversion in the functional membrane of photosynthesis. Analysis by light pulse and electric pulse methods. The central role of the electric field. *Biochim. Biophys. Acta*, 505: 355-427.

15. Calvin, M. and Bassham, J.A. 1962. "The Photosynthesis of Carbon Compounds", Benjamin, W.A., Inc., New York.
16. Ruben, S., Randall, M., Kamen, M.D. and Hyde, J.L. 1941. Heavy oxygen /O¹⁸/ as a tracer in the study of photosynthesis. J. Ann. Chem. Soc. 63: 877-885.
17. Joliot, P. and Kok, B. 1975. Oxygen evolution in photosynthesis. In "Bioenergetics of Photosynthesis", edited by Govindjee, Academic Press, New York - San Francisco - London, pp. 387-412.
18. Hill, R. and Bendall, F. 1960. Function of the two cytochrome components in chloroplasts: a working hypothesis. Nature 186: 136-137.
19. Emerson, R. and Lewis, C.M. 1943. The dependence of the quantum yield of Chlorella photosynthesis on wavelenght of light. Am. J. Botany, 30: 165-172.
20. Williams, W.P. 1977. The two photosystems and their interactions. In "Primary Processes of Photosynthesis", edited by Barber, J. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam - New York - London, pp. 399-448.
21. Farkas, G. 1978. Növényi Biokémia. Akadémiai Kiadó, Budapest, 35.
22. Pearlstein, R.M. 1967. Migration and trapping of excitation quanta in photosynthetic units. In "Energy Conversion by the Photosynthetic Apparatus",

- Brookhaven Symp. Biol. No. 19. Brookhaven Nat. Lab. Upton, New York, pp. 8-15.
23. Robinson, G.W. 1967. Excitation transfer and trapping in photosynthesis. In "Energy Conversion by the Photosynthetic Apparatus", Brookhaven Symp. Biol. No. 19. Brookhaven Nat. Lab., Upton, New York, pp. 16-48.
24. Duysens, L.N.M. 1967. Primary photosynthetic reactions in relation to transfer of excitation energy. In "Energy Conversion by the Photosynthetic Apparatus", Brookhaven Symp. Biol. No. 19. Brookhaven Nat. Lab., Upton, New York, pp. 71-80.
25. Borisov, A.Yu. and Godik, V.I. 1973. Excitation energy transfer in photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta, 301: 227-248.
26. Förster, Th. 1947. Ein Beitrag zur Theorie der Photosynthese. Z. Naturforsch. 2b: 174-182.
27. Förster, Th. 1965. Delocalized excitation and excitation transfer. In "Modern Quantum Chemistry", Istanbul Lectures, edited by Sinanoglu, O., Academic Press, New York and London, Part III. pp. 93-137.
28. Förster, Th. 1968. Mechanisms of energy transfer. In "Energetics and Mechanism in Radiation Biology", edited by Phillips, G.O., Academic Press, London - New York, pp. 183-201.

29. Boriszov, A.Yu. 1967. Teorija rezonansznoj migracii energii v pigmentnüh komplekszah fotoszintetizirujusih organizmov. Biofizika, 12: 630-636.
30. Boriszov, A.Yu., Fetiszova, Z.G. 1971. Iszledovanyia rezonansznoj migracii energii v heterogennom kompleksze. Moljekuljarnaja Biologija 5: 509-517.
31. Seely, G.R. 1973. Energy transfer in a model of the photosynthetic units of green plants. J. theor. Biol. 40: 189-199.
32. Seely, G.R. 1977. Chlorophyll in model systems. In "Primary Processes of Photosynthesis", edited by Barber, J., Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam - New York - London, pp. 1-54.
33. Govindjee and Govindjee R. 1975. Introduction to photosynthesis. In "Bioenergetics of Photosynthesis", edited by Govindjee, Academic Press, New York - - San Francisco - London, pp. 1-51.
34. Ke, B. and Sperling, W. 1967. Evidence for the presence of ordered aggregates in chlorophyll-a monolayers. In "Energy Conversion by the Photosynthetic Apparatus", Brookhaven Symp. Biol., No. 19. Brookhaven Nat. Lab., Upton, New York, pp. 319-327.
35. Litvin, F.F. 1965. Modelirovanyije szisztemü agregirovannüh form klorofilla i szoporavozsdajuscsih pigmentov v rasztvorah, plenkah i monomoljekuljárnüh szlojáh. Iz "Biohimija i Biofizika Fotoszinteza",

- pod. red. Krasznovszkij, A.A., Izd. Nauka Moskva, pp. 96-125.
36. Gurinovics, G.P., Szevcsenko, A.N., Szolovjev, K.N. 1968. "Spektroszkopija klorofilla i rodstvennih szajegyinenij". Izd. Nauka i Tehnika, Minszk, Glava: 5,6,9,10,.
37. Lehoczki, E. and Csatorday, K. 1975. Energy transfer by chlorophyll-b detergent micelles. *Biochim. Biophys. Acta*, 396: 86-92.
38. Lehoczki, E. 1975. New chlorophyll-b forms in a chlorophyll-detergent photosynthetic model system. *Biochim. Biophys. Acta*, 408: 223-227.
39. Krasnovsky, A.A. 1965. Photochemistry and spectroscopy of chlorophyll, bacteriochlorophyll and bacterioviridin in model system and photosynthetizing organisms. *Photochem. Photobiol.* 4: 641-647.
40. Rabinovitch, E.I., Szalay, L., Das, M., Murty, N.R., Cederstand, C.M. and Govindjee 1967. Spectral properties of cell suspensions. In "Energy Conversion by the Photosynthetic Apparatus", Brookhaven Symp. Biol. No. 19. Brookhaven Nat. Lab., Upton, New York. pp. 1-7.
41. Cramer, W.A. and Butler, W.L. 1968. Further resolution of chlorophyll pigments in photosystems 1 and 2 of spinach chloroplasts by low-temperature derivative spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 153: 889-891.

42. Gasanov, R.A. and French, C.S. 1973. Chlorophyll composition and photochemical activity of photosystems detached from chloroplast grana and stroma lamellae. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70. No 7: 2082-2085.
43. Demeter, S., Horváth, G., Joó, F., Halász, N. and Faludi-Dániel, Á. 1974. Stacking capacity and chlorophyll forms of thylacoids in normal and mutant maize chloroplasts of different granum content. Physiol. Plant. 32: 222-227.
44. Litvin, F.F. and Sineshchekov, V.A. 1975. Molecular organization of chlorophyll and energetics of the initial stages in photosynthesis. In "Bioenergetics of Photosynthesis", edited by Govindjee, Academic Press, New York - San Francisco - London, pp. 619-661.
45. Brown, J.S. 1977. Spectroscopy of chlorophyll in biological and synthetic systems. Photochem. Photobiol. 26: 319-326.
46. Govindjee, Papageorgiu, G. and Rabinowitch, E. 1967. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis. In "Fluorescence Theory, Instrumentation and Practice", edited by Guilbault, G.G., Marcel Dekker Inc., New York, pp. 511-569.
47. Litvin, F.F., Guljajev, B.A., Szinyescsekov, V.A. 1971. Szpektralnüle haraktyerisztyiki, otnoszityelnaja koncentracija i koefficientü migracii energii 10 natyivnüh form klorofill-a. Dokl. Akad. Nauk. SZ. SZ.SZ.R. 199: 1428-1431.

48. Garab, Gy.I., Horváth, G. and Faludi-Dániel, Á. 1974. Resolution of the fluorescence bands in greening chloroplasts of maize. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 56: 1004-1009.
49. Garab, Gy.I., Cherniseva, S., Kiss, J.G. and Faludi-Dániel, Á. 1976. Chlorophyll forms affected by 3/3,4-dichlorophenyl/-1,1-dimethylurea as shown by low temperature fluorescence spectra of chloroplasts and fragments. *FEBS Letters* 61: 140-143.
50. Butler, W.L. 1978. Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29: 345-378.
51. Katz, J.J., Dougherty, R.C. and Boucher, L.J. 1966. Infrared and nuclear magnetic resonance spectroscopy of chlorophyll. In "The Chlorophyll", edited by Vernon, L.P. and Seely, G.R., Academic Press, New York - London, pp. 186-253.
52. Katz, J.J. 1973. Chlorophyll interactions and light conversion in photosynthesis. *Naturwissenschaften* 60: 32-39.
53. Cotton, T.M., Trifunac, A.D., Ballschmiter, K. and Katz, J.J. 1974. State of chlorophyll-a in vitro and in vivo from electronic transition spectra, and the nature of antenna chlorophyll. *Biochim. Biophys. Acta* 368: 181-198.

54. Lutz, M. 1975. Resonance Raman spectroscopy of the chlorophylls in photosynthetic structures at low temperature. In "Lasers in Physical Chemistry and Biophysics", edited by Joursot-Dubien, J., Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, pp. 451-463.
55. Lutz, M. 1977. Antenna chlorophyll in photosynthetic membranes: a study by resonance Raman spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 460: 408-430.
56. Emerson, R. 1958. The quantum yield of photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 9: 1-29.
57. Goedheer, J.G. 1957. Optical properties and in vivo orientation of photosynthetic pigments. Ph.D. Thesis, Univ. of Utrecht, of Netherlands.
58. Seely, G.R. 1973. Effects of spectral variety and molecular orientation on energy trapping in the photosynthetic unit: a model calculation. *J. Theor. Biol.* 40: 173-187.
59. Michel-Villaz, M. 1976. Fluorescence polarisation: pigment orientation and energy transfer in photosynthetic membranes. *J. Theor. Biol.* 58: 113-129.
60. Szalay, L. 1974. Foszintezis. A "Biofizika"-ból, Szerkesztette Ernst, J., Akadémiai Kiadó; Budapest, pp. 440-441.
61. Breton, J. 1977. Contribution a l etude de l orientation des pigments dans les membranes photosynthe-

- tiques par spectroscopie optique en lumiere polarisee. These, Univ. Paris-sud, Orsay.
62. Gregory, R.P.F. 1977. Linear and circular dichroism the organisation of the photosynthetic membrane. In "Primary Processes of Photosynthesis", edited by Barber, J., Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam - New York - London, pp. 465-492.
 63. Weber, F. 1936. Doppelbrechung und Grana der Chloroplasten. Molsch-Festschrift. 447-451.
 64. Menke, W. 1943. Dichroismus und Doppelbrechung der Chloroplasten. Biol. Zbl. 6: 326-330.
 65. Frey-Wyssling, A. and Steinmann, E. 1948. Die Schichten-doppelbrechung grosser Chloroplasten. Biochim. Biophys. Acta 2: 254-259.
 66. Sauer, K. and Calvin, M. 1962. Molecular orientation in quantasomes I. electric dichroism and electric birefringence of quantasomes from spinach chloroplast. J. Mol. Biol. 4: 451-466.
 67. Butler, W.L., Jennings, W.H., and Olson, R.A. 1962. The orientation of chlorophyll molecules in vivo: Further evidence from dichroism. Biochim. Biophys. Acta, 8: 144-146.
 68. Butler, W.L., Olson, R.A. and Jennings, W.H. 1964.a. Molecular orientation: spectral dependence of dichroism of chloroplasts in vivo. Biochim. Biophys. Acta, 88: 318-330. 1964.b. Oriented chlorophyll in

- vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 88: 651-653.
69. Thomas, J.B., Van Lierop, J.H. and Ten Ham, M. 1967. Dichroism in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 143: 204-220.
70. Breton, J. and Roux, E. 1971. Chlorophylls and carotenoids states in vivo I. A linear dichroism study of pigments orientation in spinach chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 45: 557-563.
71. Morita, S. and Miyazaki, T. 1971. Dichroism of bacteriochlorophyll in cells of the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas Palustris*. *Biochim. Biophys. Acta* 245: 151-199.
72. Faludi-Daniel, Á. and Breton, J. 1975. A linear dichroism study using chloroplasts of various structure and pigment composition. *Photochem. Photobiol.* 22: 125-127.
73. Demeter, S., Sagromsky, H. and Faludi-Daniel, Á. 1976. Orientation of chlorophyll-b in thylakoids of barley chloroplasts. *Photosynthetica* 10: 193-197.
74. Paillotin, G. and Breton, J. 1977. Orientation of chlorophylls within chloroplasts as shown by optical and electrochromic properties of the photosynthetic membrane. *Biophys. J.* 18: 63-79.
75. Olson, R.A., Jennings, W.H. and Butler, W.L. 1961. The orientation of chlorophyll molecules in vivo: evi-

- dence from polarised fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta*, 54: 615-617.
76. Olson, R.A., Jennings, W.H. and Butler, W.L. 1964. Molecular orientation: spectral dependence of bi-fluorescence of chloroplasts in vivo. *Biochim. Biophys. Acta*, 88: 331-337.
77. Geacintov, N.E., Van Nostrand, F. Becker, J.F. and Tinkel, J.B. 1972. Magnetic field induced orientation of photosynthetic systems. *Biochim. Biophys. Acta* 267: 65-79.
78. Goedher, J.C. 1973. Fluorescence polarization and pigment orientation in photosynthetic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, 292: 655-676.
79. Breton, J. 1975. Polarized light spectroscopy on oriented spinach chloroplasts: fluorescence emission and excitation spectra. *Proc. Third. Int. Congr. Photosynthesis*, Rehovot, edited by Avron, M. Elsevier, Amsterdam. 1: 229-234.
80. Garab, Gy.I. and Breton, J. 1976. Polarised light spectroscopy on oriented spinach chloroplasts: fluorescence emission at low temperature. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 71: 1079-1102.
81. Junge, W. and Eckhof, A. 1974. Photosynthesis studies on the orientation of chlorophyll-a₁ in the functional membrane of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 357: 103-117.

82. Junge, W. and Eckhof, A. 1974. On the orientation of chlorophyll- a_1 in the functional membrane of photosynthesis. FEBS Letters, 36: 207-212.
83. Junge, W., Schaffernicht, H. and Nelson, N. 1977. On the mutual orientation of pigments in photosystem I particles from green plants. Biochim. Biophys. Acta, 462: 73-85.
84. Sauer, K. 1965. Molecular orientation in quantasomes III. a flow dichroism apparatus and its application to the study to the structure of spinach quantasomes. Biophys. J. 5: 337-348.
85. Breton, J., Michel-Villaz, M. and Paillotin, G. 1973. Orientation of pigments and structural proteins in the photosynthetic membrane of spinach chloroplasts: a linear dichroism study. Biochim. Biophys. Acta, 314: 42-56.
86. Gagliano, A.G., Geacintov, N.E. and Breton, J. 1977. Orientation and linear dichroism of chloroplasts and sub-chloroplasts fragments oriented in an electric field. Biochim. Biophys. Acta 461: 460-474.
87. Van Nostrand, F. 1972. The in vivo orientation of chlorophyll: a spectroscopic study of magnetically oriented photosynthetic systems. Ph. D. Thesis, Univ. of New York, of U.S.A.

88. Geacintov, N.E., Van Nostrand, F. and Becker, J.F.
1974. Polarized light spectroscopy of photosynthetic membranes in magneto-oriented whole cells and chloroplasts fluorescence and dichroism. *Biochim. Biophys. Acta*, 347: 443-463.
89. Vermeaglio, A., Breton, J. and Mathis, P. 1976. Trapping at low temperature of oriented chloroplasts: application to the study of antenna pigments and of the trapp of photosystem-I. *J. Supramol. Struct.* 5: 109-117.
90. Becker, J.F., Geacintov, N.E., Van Nostrand, F. and Van Metter, R. 1973. Orientation of chlorophyll in vivo: studies with magnetic field oriented *Chlorella*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 51: 597-602.
91. Brown, J.S. 1972. Forms of chlorophyll in vivo. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23: 73-86.
92. Govindjee and Yang, L. 1966. Structure of the red fluorescence band in chloroplasts. *J. Gen. Physiol.* 49: 763-780.
93. Goedheer, J.C. 1972. Fluorescence in relation to photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23: 87-112.
94. Kamen, M.D. 1963. "Primary Process in Photosynthesis", Academic Press, New York.
95. Bowen, E.J. 1968. Fluorescence and luminescence in biology. In "Energetics and Mechanisms in Radiation Biology", edited by Phillips, G.O. Academic Press, London - New York, pp. 243-252.

96. Junge, W. 1977. Physical aspects of light harvesting. In "Encyclopedia of Plant Physiology", New Series Vol. 5, Photosynthesis I., edited by Trebs, A. and Avron, M., Springer - Verlag, Berlin-Heidelberg - New York, pp. 59-93.
97. Papageorgiu, G. 1975. Chlorophyll fluorescence: an intrinsic probe of photosynthesis. In "Bioenergetics of Photosynthesis", edited by Govindjee, Academic Press, New York - San Francisco - London, pp. 320-336.
98. Lavorel, J. and Etienne, A-L. 1977. In vivo chlorophyll fluorescence. In "Primary Processes of Photosynthesis", edited by Barber, J., Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam - New York - London, pp. 203-268.
99. Park, R.B. 1966. Chloroplast structure. In "The Chlorophyll", edited by Vernon, L.P. and Seely, G.R., Academic Press, New York, London, pp. 283-311.
100. Garab, Gy.I. Kiss, J.G. and Michel-Villaz, M. 1977. Orientation of the emitting dipoles in the chloroplast membranes. In "Pigment-Protein Complexes in Photosynthesis". Szeged.
101. Knox, R.S. and Davidovich, M.A. 1978. Theory of fluorescence polarisation in magnetically oriented photosynthetic systems. Biophys. J. 24: 689-712.

102. Björkman, O. and Gauhl, E. 1969. Carboxydismutase activity with and without -carboxylation photosynthesis. *Planta* 88: 197-203.
103. Woo, K.C., Anderson, J.M. Boardman, N.K. Downton, W.J.S., Osmond, C.B. and Thorne, S.W. 1970. Deficient Photosystem II. in agranal bundle sheath chloroplasts of C_4 plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 67: 18-25.
104. Anderson, J.M. and Boardman, N.K. 1966. Fractionation of the photochemical systems of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 112: 403-421.
105. French, C.S. 1960. Chlorophylls in vivo and in vitro. In "Encyclopedia of Plant Physiology". Vol. VII, edited by Ruhland, W., Springer Verlag, Heidelberg, pp. 250-271.
106. Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde - glutaraldehyde - fixative of high osmolarity for use in electron-microscopy. *J. Cell. Biol.* 27: 133-138.
107. Millonig, G. 1961. Advantages of a phosphate buffer for OsO_4 solutions in fixation. *J. Appl. Phys.* 32: 1634-1638.
108. Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate of high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17: 208-212.
109. Mustárdy, L.A. and Jánossy, A.G.S. 1979. Evidence of helical thylakoid arrangement by reanning electron

microscopy. *Plant. Sci. Lett.*-be közlésre elfogadva.

110. Clement-Metral, J. 1975. Direct observation of the rotation in a constant magnetic field of highly organized lamellar structures. *FEBS Letters*, 50: 257-260.
111. Sacler, D.M. 1976. X-ray diffraction from chloroplast membranes oriented in a magnetic field. *FEBS Letters*, 67: 289-293.
112. Neugebauer, D-CH., Blaurok, A.E. and Worcester, D.L. 1977. Magnetic orientation of purple membranes demonstrated by optical measurements and neutron scattering. *FEBS Letters*, 78: 31-35.
113. Satoh, K. 1972. Effects of urea and Q-phenantroline on F-695 emission in chloroplasts. *Plant and Cell Physiol.* 13: 23-39.
114. Breton, J., Michel-Villaz, M., Paillotin, G. and Vondevyver, M. 1972. Application of linear dichroism to the study of the distribution of pigments in monomolecular layers. *Thin Solid Films* 13: 351-357.
115. Breton, J., Roux, E. and Whitmarsh, J. 1975. Dichroism of chlorophyll- a_1 absorption change at 700 nm using chloroplasts oriented in magnetic field. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 64: 1274-1277.
116. Breton J. 1977. Dichroism of transient absorbance changes

in the red spectral region using oriented chloroplasts II. P-700 absorbance changes. Biochim. Biophys. Acta, 459: 66-75.

117. Vaszin, Yu.A., Verhotyurov, V.N. 1979. Iszledovanyije poljářizacii fluoreszcencii hlorellü i hloroplasztov goroha, orientyirovannüh v magnyitnom polje. Biofizika 24: 260-263.