

УДК 541.144.7

Физико-химические исследования механизмов и регуляции фотосинтеза высших растений

2. Индукция люминесценции в исследованиях регуляции фотосинтеза

А. К. Кукушкин, С. А. Кузнецова, А. А. Долгополова

АНАСТАСИЯ АЛЕКСАНДРОВНА ДОЛГОПОЛОВА — кандидат физико-математических наук, преподаватель кафедры медицинской и биологической физики Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова. Область научных интересов: биофизика фотосинтеза, математическое моделирование.

Введение

Взаимодействие световых и темновых реакций фотосинтеза особенно ярко проявляется в процессах индукции, когда осуществляется переход адаптированного к темноте состояния растения к стационарному фотосинтезу под действием возбуждающего света. В период индукции происходит активация ферментов цикла Кальвина (Кальвина)*, зависящая от концентрации метаболитов цикла и резервных веществ, а также от энергетического потенциала растительной клетки. На практике для изучения индукционных процессов часто используют свечение флуоресценции или замедленной люминесценции фотосинтезирующих объектов. Поскольку световые стадии фотосинтеза через цепь электронного транспорта связаны с темновыми реакциями ассимиляции углерода, то свечение люминесценции зависит не только от состояния светособирающих пигментов и компонентов цепи электронного транспорта, но и от активности процессов в цикле Кальвина. В связи с этим большой интерес представляет изучение влияния транспорта и запасаания продуктов ассимиляции углерода на первичные процессы фотосинтеза.

Как и в других процессах метаболизма, в процессах ассимиляции углерода при фотосинтезе действуют механизмы контроля или регуляции. Регуляция осуществляется посредством изменения активности ферментов и концентраций по закону действующих масс, а также транспорта метаболитов между хлоропластом и окружающей его средой.

Цель данной работы состоит в исследовании механизмов регуляции цикла Кальвина и транспорта электронов при изменении транспорта продуктов ассимиляции CO_2 , а также регуляторной роли синтеза

крахмала методами индукции флуоресценции и замедленной люминесценции.

Список используемых сокращений

АДФ — аденозиндифосфорная кислота
АТФ — аденозинтрифосфорная кислота
АДФГ — АДФглюкоза
НАДФН — восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата
 Ф_n — неорганический фосфат
ТФ — триозофосфат
АДФгаза — АДФглюкозопирофосфорилаза
ФГА — фосфоглицериновый альдегид
ФГК — фосфоглицериновая кислота (фосфоглицерат)
ДФГК — дифосфоглицериновая кислота (дифосфоглицерат)
РДФ — рибулозодифосфат
Р5Ф — рибулозо-5-фосфат
ТФТ — триозофосфатный транслокатор
Ф6Ф — фруктозо-6-фосфат
ФДФ — фруктозо-1,6-дифосфат
Г1Ф — глюкозо-1-фосфат
Г6Ф — глюкозо-6-фосфат
Г3Ф — глицеральдегид-3-фосфат
ДГАФ — дигидроксиацетонфосфат
С7Ф — седогептулозо-7-фосфат
СДС — седогептулозо-1,7-дифосфат

Индукционные явления в фотосинтезе

Индукция фотосинтеза

Фотосинтетические процессы выделения O_2 и фиксации CO_2 развивают максимальную скорость спустя несколько минут с момента освещения зеленых листьев, которые до этого находились в полной темноте. Эта начальная задержка фотосинтеза, получившая название индукции [1], — искусственный процесс, резкий переход растения из темноты в условия яркого освещения в природе встречается очень редко. Тем не менее индукция фотосинтеза отражает регуляторные взаимодействия его световых и темновых ста-

* Напомним, что цикл Кальвина — это восстановительный пентозофосфатный цикл, в котором диоксид углерода восстанавливается до углеводов с использованием энергии НАДФН и АТФ.

дий. Изучение процессов индукции позволяет лучше понять механизмы регуляции фотосинтеза и взаимосвязь между хлоропластом и клеткой, в которой он находится.

Впервые периоды индукции фотосинтеза, которые длились несколько минут при комнатной температуре, зарегистрировали Остерхаут и Хасс, проводившие в 1918 г. опыты с зеленой водорослью *Ulya*, а также Варбург, работавший в 1920 г. с хлореллой. Наиболее важные исследования индукционных процессов фотосинтеза провели Мак-Алистер и Майерс, измерявшие поглощение CO_2 листьями пшеницы [1].

Индукция фотосинтеза, как предполагали Остерхаут и Хасс, объясняется либо световой активацией ферментов и их дезактивацией в темноте, либо исчерпанием в темноте промежуточных продуктов, образованных в цикле Кальвина на свету. В темноте происходит фиксация углерода и, следовательно, расходуется акцептор CO_2 , для восстановления которого требуются АТФ и НАДФН, которые в темноте не синтезируются. Поэтому со временем концентрация акцептора CO_2 и других метаболитов цикла Кальвина уменьшается.

Современные исследователи придерживаются представлений о взаимодействии этих двух механизмов индукции: световой активации ферментов и накопления промежуточных продуктов [1]. Так, постепенное накопление важного промежуточного продукта может также вызвать аллостерическую активацию фермента, катализирующего синтез этого продукта. В пользу объяснения индукции фотосинтеза активацией ферментов на свету и накоплением промежуточных продуктов свидетельствует факт о недостатке акцептора CO_2 в начале светового периода и о автокаталитическом изменении его концентрации на свету до уровня, необходимого для протекания фотосинтеза [2]. Накопление акцептора CO_2 в индукционный период происходит не только по принципу автокатализа, но и благодаря тому, что триозофосфат (ТФ) в основном включается обратно в цикл Кальвина, а не превращается в крахмал или экспортируется в цитозоль. Кроме ТФ, на индукционный период оказывает влияние наличие фосфоглицериновой кислоты (ФГК) и неорганического фосфата (F_n). Реакция превращения ФГК в дифосфоглицериновую кислоту является энергетически невыгодной, она осуществляется при высоких концентрациях ФГК и чувствительна к снижению соотношения $[\text{АТФ}]/[\text{АДФ}]$, следовательно, индукционный период связан с увеличением концентрации ФГК. Если в среде присутствует большое количество F_n , то ТФ будет выходить из цикла и индукционный период возрастет, так как на регенерацию рибулозодифосфата (РДФ) потребуется больше времени [1]. В работе [3] на мутантах табака с ограничением транспорта F_n и ТФ было показано, что содержание ФГК в них возрастает по сравнению с растениями диконого типа, и индукционный период сокращается. Таким образом, в процессах индукции фотосинтеза проявляются многие механизмы его регуляции.

Индукция флуоресценции и замедленной люминесценции фотосистемы 2

Как было указано выше, одним из методов изучения индукции фотосинтеза в целых растениях и листьях является исследование кинетики флуоресценции

и замедленной люминесценции, обусловленной работой ФС 2. В процессах поглощения и передачи энергии молекулами пигментов существует вероятность ее потери, в том числе в результате излучения квантов света с энергией, равной энергии перехода молекулы пигмента из первого синглетного возбужденного состояния в основное. Напомним, что излучение, возникающее до того, как произойдет разделение зарядов в реакционном центре фотосистемы, называется флуоресценцией. Если излучение происходит в результате рекомбинации первоначально разделенных зарядов в реакционном центре, то говорят о замедленной люминесценции (послесвечение). Рекомбинационные процессы происходят как в ФС 1, так и в ФС 2. Однако замедленная люминесценция из ФС 1 по интенсивности составляет не более 1% от общей интенсивности послесвечения [4]. По спектру замедленная люминесценция и флуоресценция не отличаются, но имеют разное время затухания [5].

Индукционная кривая флуоресценции состоит из двух фаз: быстрой, когда в первую секунду облучения происходит усиление флуоресценции (подъем кривой), и медленной, когда в течение нескольких минут наблюдается спад свечения. Быстрая фаза относится к первичным процессам в ФС 2, а медленная фаза связана с взаимодействиями между процессами в мембранах хлоропласта — тилакоидах и метаболическими процессами в строме. Напомним, что строма — это часть хлоропласта, окружающая тилакоиды, в которой присутствуют растворенные ферменты, связанные главным образом с метаболизмом углерода [6].

Спектр замедленной люминесценции подобен спектру флуоресценции, положение максимума замедленной люминесценции, возникающего в первую секунду индукционного периода, совпадает с максимумом флуоресценции. Величины этих максимумов отражают окислительно-восстановительные переходы на акцепторной стороне ФС 2. Быстрая фаза индукции замедленной люминесценции также приписывается изменениям электрического потенциала, зависящего от состояния реакционного центра ФС 2. Второй ее максимум (возникает примерно на 10-й секунде индукционного периода) может быть связан с индуцируемыми фотонами градиентом протонов, а также с инициацией темновых реакций фотосинтеза [7]. Между быстрой и медленной фазами замедленной люминесценции наблюдается хорошо выраженный спад, который, возможно, является результатом закрытия реакционных центров ФС 2 в течение восстановления пулов пластохинонов (переносчики электронов между двумя фотосистемами). Последующие небольшие по интенсивности максимумы замедленной люминесценции, вероятно, связаны с активацией цикла Кальвина, иницируемой накоплением АТФ и восстановлением АДФ. На практике выделить все перечисленные компоненты индукционной кривой замедленной люминесценции можно путем одновременной регистрации сигнала в 50-ти последовательных временных интервалах длительностью 100 мкс каждый [8].

Интенсивность флуоресценции и замедленной люминесценции пропорциональна концентрации возбужденных молекул пигментов, образующихся как при поглощении квантов света и передаче энергии возбуждения от соседних молекул пигментов, так и в результате вторичного заселения возбужденных со-

стояний в обратных реакциях первичных фотопродуктов. Поэтому регистрация свечения позволяет судить об эффективности переноса поглощенного кванта света к реакционному центру, о скорости разделения зарядов в нем и использовании энергии разделенных зарядов в окислительно-восстановительных реакциях компонентов реакционного центра с компонентами электрон-транспортной цепи фотосинтеза. Так, в исследовании [9] на суспензии клеток *Scenedesmus obliquus* было показано, что различия в кинетике флуоресценции, наблюдаемые при повышении температуры, в случае обработки при различных концентрациях гидросиламином, действующим как электронный донор для реакционного центра ФС 2, и при добавлении диурона, известного как блокатор электронного переноса между Q_A и Q_B — первичным и вторичным хинонными переносчиками электронов между фотосистемами, могут быть объяснены дисбалансом между электронным потоком из реакционного центра на акцептор и электронным потоком на реакционный центр от донора. Помимо этого, измерение флуоресценции хлорофилла в совокупности с измерениями скорости выделения кислорода и поглощения диоксида углерода позволяет оценить скорость электронного транспорта [10].

Поскольку световые реакции фотосинтеза через цепь электронного транспорта связаны с темновыми реакциями фиксации CO_2 и образования углеводов, то вероятность потери энергии возбуждения на различных этапах ее преобразования зависит не только от состояния пигментов и компонентов электрон-транспортной цепи, но и от активности процессов, происходящих в темновой стадии фотосинтеза. В поддержку этого свидетельствуют данные о том, что начальный подъем кривой флуоресценции целых листьев соответствует уменьшению скорости фотосинтеза, наблюдаемому по скорости поглощения CO_2 листьями пшеницы [1]. Кривые индукции флуоресценции и замедленной люминесценции можно сравнивать по ширине, измеряемой на полувысоте между максимумом и стационарным участком. По ширине индукционных кривых качественно можно судить о скорости электронного транспорта, о скоростях темновых реакций ассимиляции CO_2 и образования углеводов.

Таким образом, исследование кинетики индукции флуоресценции и замедленной люминесценции позволяет получить информацию о состоянии фотосинтетического аппарата и об эффективности процессов ассимиляции углерода в интактной клетке.

Регуляция фотосинтеза. Влияние метаболитов и резервных веществ на эффективность фотосинтеза

Влияние триозофосфатного транслокатора

В исследовании [11], выполненном на листьях шпината и ячменя, было показано, что для функционирования цикла Кальвина необходим постоянный запас неорганического фосфата (Φ_n), который поддерживается синтезом сахарозы в цитозоле — жидкой части растительной клетки, расположенной вне хлоропласта. Это позволило авторам предположить, что Φ_n обменивается на фосфаты сахаров. Такой обмен ортофосфата на триозофосфат был обнаружен при прямых измерениях методами фильтрации и центри-

фугирования [1]. Показано также, что обмен Φ_n на ТФ осуществляется специальным белком [12] — триозофосфатным транслокатором (ТФТ). Этот белок — переносчик ортофосфата — опосредует транспорт фиксированного углерода в форме ТФ и ФГК из хлоропласта в цитозоль. Экспортированные метаболиты затем используются для синтеза сахарозы и аминокислот, а освобожденный Φ_n возвращается обратно в хлоропласт через ТФТ для образования АТФ [12–14].

Белок ТФТ — димер, состоящий из двух идентичных субъединиц, содержит от шести до восьми гидрофобных доменов, которые образуют трансмембранные α -спирали [15]. Он принадлежит к семейству переносчиков фосфата, которые различаются местами локализации в растении, связываемыми субстратами и механизмами их переноса [15].

В качестве субстратов ТФТ допускает или неорганические фосфаты, или фосфат, присоединенный к концу трикарбонной цепи, такой как ТФ или ФГК. В физиологических условиях ТФТ осуществляет обмен субстратами в соотношении 1 : 1 [12]. Транспорт веществ через ТФТ происходит по принципу пинг-понга, т.е. первый субстрат переносится через мембрану и затем покидает транспортный участок перед тем, как второй субстрат может быть связан и транспортирован. Таким образом, транспортный участок открыт либо в межмембранное пространство, либо в строму, благодаря чему субстраты транспортируются в противоположных направлениях [12].

ТФТ является важным связующим звеном между процессами метаболизма в хлоропласте и в цитозоле, осуществляющим регуляцию важнейших процессов жизнедеятельности растительной клетки, таких как запасание углерода и фиксация CO_2 . Регуляция происходит посредством обмена Φ_n , ТФ и ФГК, которые находятся как в хлоропласте, так и в цитозоле и конкурируют за связывание с ТФТ. Активность ТФТ посредством изменения генной экспрессии может контролироваться концентрацией фосфата внутри и снаружи хлоропласта. Например, низкая концентрация неорганического фосфата в цитозоле ограничивает транспортную активность ТФТ [15]. Это приводит к накоплению метаболитов цикла Кальвина в хлоропласте, уменьшению уровня ортофосфата в строме и усиленному производству крахмала [16].

Влияние неорганического фосфата

Наиболее важным процессом в жизнедеятельности растительной клетки является обмен неорганического фосфата с триозофосфатом, осуществляемый триозофосфатным транслокатором.

Высокие концентрации «внешнего» ортофосфата приводят к увеличению скорости экспорта синтезированных веществ, при этом возрастает уровень «внешних» триоз [1, 11, 12]. Такой обмен регулируется по типу отрицательной обратной связи — высокий уровень ТФ в цитозоле приводит к уменьшению экспортной способности ТФТ [12, 17]. В растениях, выращенных на среде с недостатком неорганического фосфата, наблюдается усиленный поток ТФ, приводящий к накоплению крахмала [18]. Это явление можно объяснить тем, что недостаток неорганического фосфата снаружи хлоропласта компенсируется его образованием в строме хлоропласта при синтезе крахмала. Таким образом, ТФТ обеспечивает под-

держание баланса неорганического фосфата внутри и снаружи хлоропласта.

Измененный уровень «внешнего» ортофосфата косвенно влияет на активность ферментов цикла Кальвина посредством вариации концентрации интермедиатов цикла в хлоропласте [19]. В частности, уменьшение накопления крахмала и, следовательно, недостаток неорганического фосфата в строме приводят к снижению скорости фотосинтеза. Недостаток ортофосфата в строме и, как следствие, подавление фотосинтеза может возникать не только по причине изменения скорости различных реакций, затрагивающих производство Φ_n , но и в условиях акклиматизации к низким температурам [20, 21]. Таким образом, если ТФ выходит из хлоропласта через ТФТ благодаря высокой концентрации «внешнего» Φ_n , то на регенерацию рибулозодифосфата (РДФ) идет его меньше и для активации РДФ-карбоксилазы требуется больше времени, следовательно, фиксация CO_2 замедляется [1, 22]. Из сказанного выше можно сделать заключение о том, что высокие концентрации неорганического фосфата в цитозоле ограничивают скорость фотосинтеза. Ограничение может быть снято добавлением ФГК или ТФ, что активизирует работу ТФТ в мембране хлоропласта [1, 11].

Влияние синтеза крахмала

Регуляторное действие концентраций Φ_n , ТФ и ФГК в цитозоле на фотосинтетическую фиксацию CO_2 отражается в их влиянии на транспортную способность ТФТ и может служить главным фактором в контроле разделения углеродного потока между экспортом и запасанием в хлоропласте. Увеличение уровня экспортированных продуктов фотосинтеза в цитозоле приводит к перераспределению углеродного потока в сторону производства крахмала [3, 17, 23] — основного резервного вещества растительной клетки, которое образуется и накапливается в хлоропласте. Крахмал синтезируется в листьях в течение дня и расходуется ночью [24]. Он образуется в строме хлоропласта из триозофосфата. Схема фотосинтеза крахмала представлена на рис 1.

Ключевым ферментом синтеза крахмала является АДФ-глюкозопирофосфорилаза (АДФГаза) [25, 26]. Этот фермент для максимальной активности требует фосфолипидат и ингибируется неорганическим фосфатом, т.е. соотношение $[\text{ФГК}]/[\Phi_n]$ является главным фактором в контроле уровня крахмала в хлоропласте [27, 28]. Увеличение соотношения $[\text{ФГК}]/[\Phi_n]$ в строме приводит к возрастанию производства крахмала благодаря аллостерической активации АДФГазы. При высоких концентрациях CO_2 в атмосфере происходит стимуляция фотосинтеза, которая ограничивается накоплением крахмала в хлоропласте [29]. Интенсификация синтеза крахмала в хлоропласте может происходить за счет уменьшения доступности фосфата в цитозоле [1, 3, 12, 13, 30]. Если ингибировать синтез крахмала, как это было сделано в работах [35, 37], то триозофосфат будет выходить из хлоропласта и скорость ассимиляции CO_2 уменьшится. Подтверждением этого может служить тот факт, что мутанты арабидопсиса с дефицитом крахмала имеют низкую скорость фотосинтеза [31]. Таким образом, изменяя скорость синтеза крахмала путем варьирования концентраций

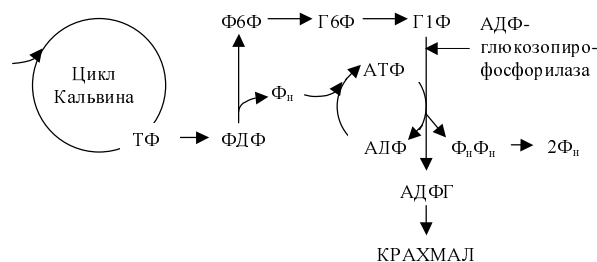


Рис. 1. Схема реакций синтеза крахмала.

Обозначения см. в списке сокращений на с. 76

ТФ, ФГК и Φ_n внутри и снаружи хлоропласта, можно воздействовать на скорость фиксации CO_2 .

Синтез крахмала происходит не только в листьях, но и в эндосперме созревающих семян. В этом случае в производстве крахмала участвует сахароза, превращающаяся в АДФГ. Растворимая АДФГ переходит в нерастворимый полиглюкан. Ферментом, отвечающим за производство АДФГ, является АДФГаза. Помимо этого фермента в синтезе крахмала в развивающейся эндосперме участвуют разветвляющий фермент и фермент, расщепляющий разветвленную структуру [32, 33].

Известно два гена, влияющих на содержание резервных веществ в зародыше гороха. Эти гены кодируют ключевые ферменты синтеза крахмала. Ген R отвечает за фермент, разветвляющий крахмал, а ген Rb — за АДФГазу. (Мутации в этих генах обозначаются строчными буквами r и rb, соответственно.) Генотип семян гороха может быть представлен четырьмя способами в зависимости от наличия или отсутствия мутаций генов R и Rb, а именно RRRbRb (дикий тип), rRbRb, RRrbRb, rrrrb (двойной мутант). Наличие мутантного гена r приводит к уменьшению содержания крахмала в семенах гороха примерно от 55% до 35% сухой массы и к изменению содержания амилозы в крахмале от 35% до 65%. В семенах с мутантным геном rb содержание крахмала уменьшается на столько же, как и с геном r, однако содержание амилозы в крахмале в случае мутации rb сокращается на 20% [34]. Наличие двух мутантных генов r и rb приводит к уменьшению содержания крахмала примерно на 25% сухой массы семян, при этом содержание амилозы в крахмале составляет 50%.

Подобные мутанты являются удобным инструментом для исследования роли синтеза крахмала как в развитии семян, так и в росте и развитии целого растения.

Теоретические модели фотосинтеза

Существует много математических моделей, описывающих стационарное функционирование цикла Кальвина и его отдельных реакций, однако они не включают первичные стадии фотосинтеза, что не дает возможности исследовать процессы индукции, функционирование цикла Кальвина при различных интенсивностях возбуждающего света и при различных концентрациях АТФ и НАДФН [35, 36]. Так, в работе [33] представлена математическая модель фотосинтетического образования углеводов в C_3 -растениях в условиях интенсивного освещения в атмосфере CO_2 [36]. Модель содержит реакции цикла Кальвина с

экспортом ТФ и производством крахмала; концентрации НАДФН, НАД⁺, СО₂ и Н⁺ являются фиксированными параметрами системы. С помощью этой модели было исследовано влияние Ф_н на скорость синтеза крахмала и уровни метаболитов цикла Кальвина, а также оценен вклад АТФ, Г1Ф, ФГК и Ф6Ф в производство крахмала [30, 36]. Позднее эта модель была расширена введением соотношений для работы ТФТ [17] для учета влияния на систему реакций «внешних» фосфатов ФГК, ФГА и ДГАФ. С помощью этой модели было исследовано взаимодействие ТФТ с «внешними» фосфатами ФГК, ФГА, ДГАФ и Ф_н, их влияние на скорость фиксации СО₂ и производство крахмала, а также показано, что увеличенные концентрации поступающих из хлоропласта фотосинтезирующих компонентов не подавляют скорость фотосинтеза, но направляют поток углерода на синтез крахмала, а не на экспорт.

Модель [37] содержит первичные процессы фотосинтеза, включающие перенос электрона от донора к акцептору в ФС 1, ФС 2 и от восстановленного акцептора ФС 2 на окисленный донор ФС 1, сопровождающийся синтезом АТФ. В результате переноса электронов восстанавливается НАДФН, который поступает в цикл Кальвина, представленный двумя АТФ-зависимыми реакциями. В модели авторы учли также синтез крахмала и сахарозы и работу ТФТ. С помощью этой модели было исследовано влияние Ф_н и ТФ на синтез сахарозы и скорость фиксации СО₂ [37].

Ряд работ посвящено исследованию фотосинтетических процессов, осуществляемых при импульсном освещении, что позволяет моделировать замедленную люминесценцию. Так, в [38] исследовали поглощение СО₂, перенос электронов, дыхание и фотодыхание при различных соотношениях между промежутками темноты и освещения. В [39] изучалась замедленная люминесценция высших растений в импульсном свете с помощью модели комплекса реакционного центра ФС 2, состоящей из пигмента, донора и акцептора электронов, с учетом безызлучательных переходов. Было показано, что даже в случае простой модели комплекса реакционного центра, не учитывающей сложного строения цепи электронного транспорта, в микросекундном диапазоне освещения возникает замедленная люминесценция, кинетика которой имеет немонотонный характер [39]. На кафедре биофизики в МГУ создана теоретическая модель световых и темновых процессов фотосинтеза, включающая поглощение света молекулами пигментов, перенос возбуждения на реакционный центр, электрон-транспортную цепь, фотофосфорилирование и цикл Кальвина [40]. Эта модель позволяет объяснить кривые индукции, переходные процессы при смене спектрального состава света и газового состава среды, а также моделировать периодическое освещение, что обеспечивает возможность исследования кинетики замедленной люминесценции. Рассчитана сложная кинетика миллисекундной замедленной люминесценции с максимумом и последующим выходом на стационарный уровень за время ~5 с [41]. В дальнейшем в модель [40] была введена концентрация фосфата в явном виде и с помощью усовершенствованной модели было исследовано влияние Ф_н на затухающие колебания флуоресценции, влияние НАДФН, АТФ и других переменных [42].

Вполне понятно, что для глубокого понимания функционирования растения как единого целого важ-

ны исследования механизмов взаимосвязи световых и темновых процессов фотосинтеза. Несмотря на то, что многие реакции фотосинтеза хорошо изучены, вопрос о способах их взаимодействия остается открытым. Для изучения этого вопроса нами были поставлены следующие задачи.

1. Исследование влияния неорганического фосфата на скорость фиксации СО₂, скорость синтеза крахмала и на стационарные уровни метаболитов цикла Кальвина. В ранее выполненных работах [17, 30, 36] не учитывались первичные реакции фотосинтеза, поэтому влияние Ф_н на параметры индукционных кривых не было исследовано. Первичные процессы фотосинтеза учитывались в работе [37], но исследование индукции фотосинтеза не проводилось. В задачу нашей работы входило с помощью модели [40], усовершенствованной введением в нее концентрации фосфата в явном виде, изучение влияния выхода Ф_н из цикла Кальвина, внешней концентрации фосфата и триоз на кинетику образования НАДФН. Как было показано ранее, в данной модели концентрация НАДФН является самой чувствительной переменной к изменениям внешних условий, поэтому наряду с индукцией флуоресценции интересно было проследить за кинетикой образования НАДФН.

2. Исследование кинетики замедленной люминесценции для изучения световых реакций фотосинтеза. Ранее проводилось исследование кинетики послесвечения при различном спектральном составе и интенсивности возбуждающего света и при разных условиях функционирования цепи электронного транспорта [39, 41]. Однако влияние неорганического фосфата и триоз на параметры кривых индукции замедленной люминесценции не изучалось. Одной из задач данной работы было также изучение влияния выхода неорганического фосфата из цикла Кальвина, внешней концентрации фосфата и триоз на период полуспада кривых индукции замедленной люминесценции.

3. Исследование с помощью теоретической модели влияния производства крахмала на параметры индукционных кривых флуоресценции и на концентрацию НАДФН. Поскольку имеются данные о том, что накопление крахмала линейно зависит от активности фермента АДФГазы, который активируется ФГК и ингибируется Ф_н [27], одной из задач данной работы было исследование изменения стационарной концентрации интермедиатов цикла Кальвина и синтеза крахмала от начальной внешней концентрации неорганического фосфата с помощью модели [40], усовершенствованной введением в явном виде концентрации фосфата и синтеза крахмала с учетом зависимости скорости образования крахмала от количественного соотношения [ФГК]/[Ф_н]. Такая постановка исследования была реализована впервые. Ранее в работах [17, 20, 36] была рассчитана стационарная концентрация крахмала в зависимости от внешней концентрации неорганического фосфата, однако зависимость скорости образования крахмала от соотношения [ФГК]/[Ф_н] не учитывалась.

4. Экспериментальное изучение влияния подавления синтеза крахмала на параметры индукционных кривых замедленной люминесценции. Постановка этой задачи обусловлена следующим обстоятельством. В исследовании фотосинтеза большое распространение получило использование мутантов и трансгенных

растений, в том числе и мутантов с подавленным синтезом крахмала в семенах. Несмотря на то, что семена мутантов были получены уже более десяти лет назад [34] и многие свойства и метаболические процессы в них исследованы [33, 43], тем не менее остается невыясненным влияние такой мутации в семенах на метаболические процессы, скорость ассимиляции CO₂ и первичные процессы фотосинтеза в листьях.

5. Исследование влияния снижения накопления крахмала в листьях двойного мутанта гороха *ttgbrb* по сравнению с диким типом на активацию циклического транспорта при разных температурах, в присутствии сахаров и ингибиторов циклического транспорта. Эта задача была поставлена в связи с тем, что, как было показано в [44], растения с дефицитом крахмала имеют большую концентрацию акцепторов ФС 1, чем обычные растения. Возникающее давление на акцепторной стороне ФС 1 может вызывать циклический транспорт электронов вокруг ФС 1 [45, 46].

6. Экспериментальное исследование влияния оттока сахарозы, ограничиваемого охлаждением проводящих тканей растений или введением ингибиторов транспорта сахарозы, на параметры кривой индукции замедленной люминесценции неотделенных листьев высших растений. Сахароза является основной формой, в которой углерод транспортируется по тканям растения [47]. Если влияние транспорта сахарозы на скорость реакций цикла Кальвина исследовалось во многих работах [47–49], то влияние транспорта сахарозы на скорость электронного транспорта еще не

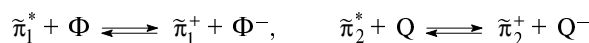
было изучено. Как уже отмечалось, для изучения влияния темновых реакций фиксации CO₂ и образования углеводов на эффективность электронного транспорта используется метод индукции замедленной люминесценции.

В нашей работе использовалась модель (рис. 2) [42], отражающая следующие процессы:

1. Поглощение квантов света $h\nu_i$ молекулами пигментов π_i светособирающего комплекса ФС 1 и ФС 2.

2. Переход молекул пигментов в возбужденное состояние: $\pi_i + h\nu_i \rightarrow \pi_i^*$. Энергия возбужденного состояния молекулы может передаваться окружающей среде безызлучательно, с излучением в виде флуоресценции или передаваться соседним молекулам пигментов, что приводит к формированию реакционного центра $\tilde{\pi}_i$, где происходит разделение зарядов.

3. Передача реакционным центром в возбужденном состоянии $\tilde{\pi}_i^*$ одного из электронов на первичный акцептор Φ для ФС 1 и Q для ФС 2:



4. Электронный транспорт, включающий перенос электрона на окисленный реакционный центр ФС 1 $\tilde{\pi}_1^+$. В модели учтен один промежуточный переносчик электрона U:

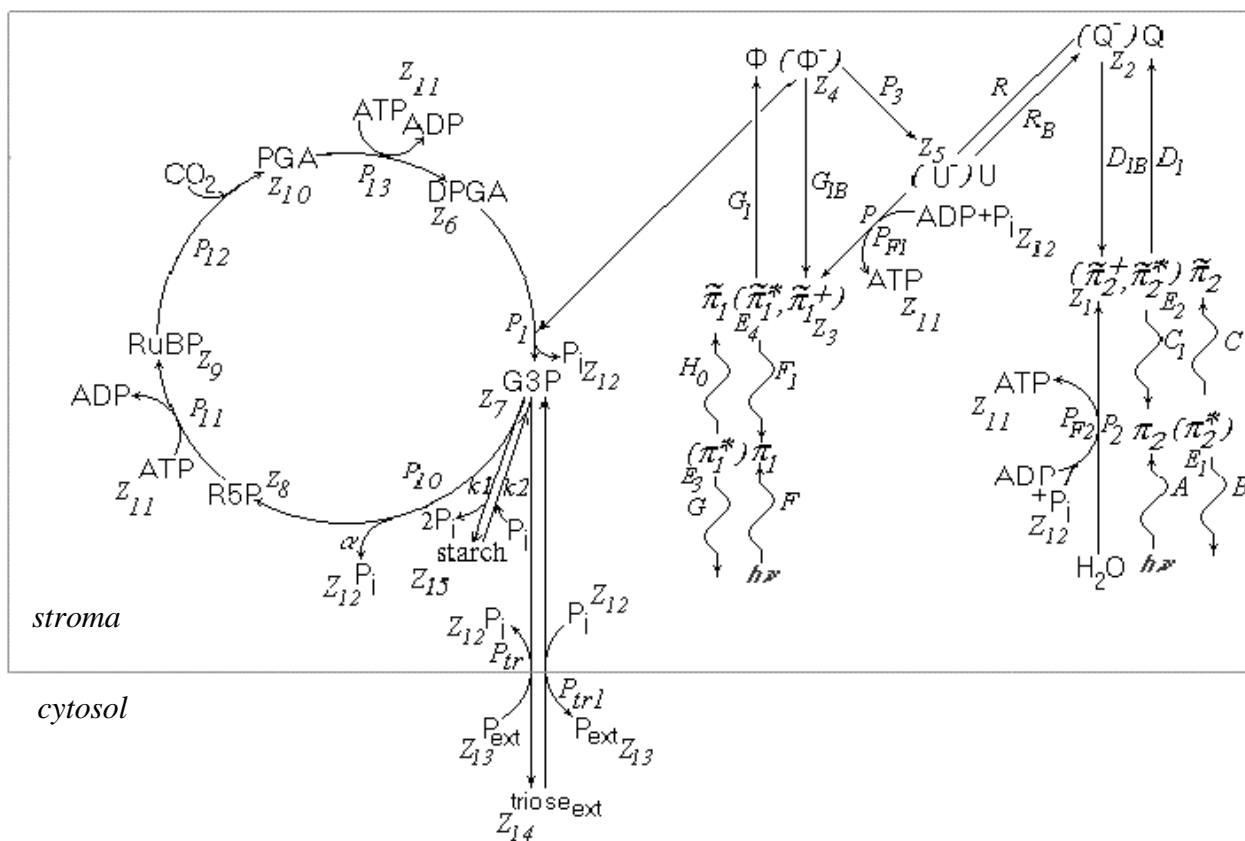
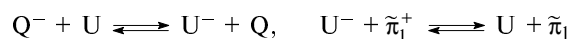
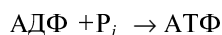


Рис. 2. Теоретическая модель фотосинтеза с учетом синтеза крахмала.

Схема заимствована из [43] с внесением дополнений

Вторая реакция сопряжена с фотофосфорилированием:

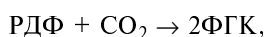
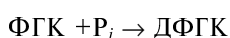


(символ P_i обозначает «внутренний» неорганический фосфат). В результате электронного транспорта восстанавливается конечный акцептор ФС 1 — НАДФ⁺.

5. Восстановление окисленного реакционного центра ФС 2 \tilde{p}_2^+ с разложением воды. Этот процесс сопровождается образованием АТФ из АДФ и P_i .

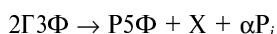
6. Циклический транспорт электронов вокруг ФС 1. На схеме он отражен реакцией переноса электрона от акцептора Φ^- на промежуточный переносчик U.

7. Работа цикла Кальвина с использованием НАДФН и АТФ, образовавшихся при электронном транспорте. На схеме цикл Кальвина представлен следующими реакциями*:



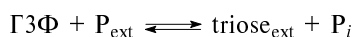
где X — обобщенный пул фосфатов сахаров, идущих на образование сахарозы и крахмала.

Выход фосфата из цикла Кальвина описывается следующими реакциями:



где α — доля фосфата, выделенного в реакции образования Р5Ф.

8. Работа фосфатного транслокатора на границе стромы и цитозоля, осуществляющего обмен «внешней» триозы ($\text{triose}_{\text{ext}}$) на «внутренний» фосфат (P_i) или «внешнего» фосфата (P_{ext}) на внутренний триозофосфат ГЗФ (или дигидроксиацетонфосфат ДГАФ):



Система дифференциальных уравнений модели приведена в [40, 42].

В рамках принятой модели рассчитывались кривые индукции замедленной люминесценции, возбуждаемой импульсным светом. Для этого в модель вводятся периодически изменяющиеся параметры, которые отвечают за интенсивность света, попадающего в ФС 1 и в ФС 2 (параметры A и F), причем длительность темнового периода и импульса света одинакова. Интенсивность замедленной люминесценции вычислялась для темнового периода, а интенсивности быстрой флуоресценции — для периода освещения.

На рис. 2 представлена несколько измененная модель по сравнению с описанными в [40, 42]. Эта модель включает синтез крахмала в явном виде (крахмал образуется из ТФ с выделением двух молекул Φ_n), учтена также обратная реакция деградации крахмала. Соответственно, в уравнения, описывающие модель, потребовалось внести ряд изменений:

$$\dot{z}_{11} = (0,1 P_{F1} \cdot P \cdot U_0 \cdot z_5 z_3 + P_{F2} \cdot P_2 \cdot z_1)(A_0 - z_{11})z_{12}/P_0 - P_{11}z_8 + P_{13}z_{10}z_{11} - k_1(z_7)^2 - k_2z_{15}$$

$$\dot{z}_{12} = -(0,1 \cdot P_{F1} \cdot P \cdot U_0 \cdot z_5 z_3 + P_{F2} \cdot P_2 \cdot z_1)(A_0 - z_{11})z_{12}/P_0 + P_{11}z_8 z_{13} P_{11} z_{12} z_{14} + P_1 z_6 z_4 + \alpha \cdot P_{10} + 2k_1(z_7)^2 - k_2z_{15}$$

$$\dot{z}_7 = P_1 z_6 z_4 - 2P_{10}(z_7)^2 - P_{11}z_8 z_{13} + P_{11} z_{12} z_{14} - k_1(z_7)^2 + k_2z_{15}$$

и включить дополнительное уравнение, характеризующее скорость изменения концентрации крахмала:

$$\dot{z}_{15} = k_1(z_7)^2 - k_2z_{15}.$$

В записанных уравнениях U_0 — число дополнительных переносчиков, приходящихся на один реакционный центр; A_0 — концентрация адениловых соединений в строме; P_0 — параметр, введенный для нормирования концентрации «внутреннего» фосфата [42]. Остальные обозначения переменных и констант скоростей реакций приведены на рис. 2.

В работе [42] для исследования влияния концентрации «внешнего» фосфата на стационарные концентрации метаболитов цикла Кальвина были проведены расчеты для двух режимов: с достаточным содержанием фосфата и с недостатком. В нашей работе рассматривался режим с недостатком фосфата, когда система более чувствительна к изменению концентрации «внешнего» фосфата. Для создания этого режима были увеличены концентрации Р5Ф, ФГК и уменьшена концентрация «внутреннего» ортофосфата. Чтобы исследовать зависимость стационарных концентраций интермедиатов цикла Кальвина и крахмала от начальной концентрации «внешнего» неорганического фосфата с учетом пропорциональности константы скорости синтеза крахмала соотношению $[\text{ФГК}]/[\Phi_n]$, в дифференциальных уравнениях, написанных выше, константа скорости синтеза крахмала k_1 принималась равной $k_1 = k_{10} + \beta \cdot z_{10}/z_{12}$.

Расчет производился с помощью программ, написанных на языке Fortran 5.0, и стандартной программы решения систем дифференциальных уравнений DFEQS в случае импульсного света и программы Merson для условия непрерывного освещения.

Исследование фотосинтеза на основе теоретической модели

Влияние метаболизма неорганического фосфата на индукцию фотосинтеза

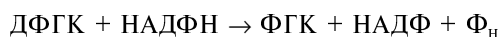
Исследования проводили путем моделирования кинетики флуоресценции при непрерывном освещении и замедленной люминесценции при импульсном свете.

Влияние неорганического фосфата на параметры индукционных кривых фотосинтеза исследовалось с помощью модели, представленной на рис. 2, но без учета синтеза крахмала. В этой модели фосфат расходуется на фотофосфорилирование и выделяется при восстановлении ДФГК, а также на выходе продукта X (пул C_3 - C_7 сахаров, идущих на синтез сахарозы и крахмала).

Поскольку скорость синтеза крахмала зависит от концентрации фосфата, то влияние скорости синтеза крахмала, в явном виде не включенного в эту модель, можно исследовать, изменяя значение коэффициента α , определяющего выход фосфата из цикла Кальвина — константы скорости образования фосфата.

* В записи реакций даны обозначения, указанные на с. 76.

Продукт X получается в реакции $2ГЗФ \rightarrow P5Ф + X$, включающей целую цепочку превращений, в результате которых образуется фосфат с константой скорости α . Две молекулы фосфата выделяются при синтезе крахмала, одна — в реакции превращения ФДФ в Ф6Ф и СДС в С7Ф. Еще одна молекула фосфата выделяется в реакции



Но в расчет коэффициента α эта молекула не входит, поскольку данная реакция непосредственно включена в модель. В зависимости от распределения триоз коэффициент α может изменяться от 1 до 2.

Из рис. 3, видно, что подъем индукционных кривых замедленной люминесценции в фотосинтезе при разных значениях α идентичен, а спад происходит быстрее по мере увеличения α . Это можно объяснить тем, что при увеличении константы скорости α на выходе продукта X образуется больше фосфата, следовательно, быстрее восстанавливается АТФ. В результате увеличивается скорость АТФ-зависимых реакций, т.е. возрастает скорость фиксации углерода. Следовательно, спад люминесценции происходит быстрее.

Результаты изучения влияния «внешнего» фосфата, содержащегося в хлоропластах, и триоз на первичные процессы фотосинтеза (первая задача наших исследований — см. выше) представлены на рис. 4 а, б. Можно видеть, что с ростом концентрации «внешнего» фосфата в начальный момент ширина кривых индукции увеличивается. Если повышается концентрация фосфата в цитозоле, то это влечет за собой выход ТФ. Однако их экспорт со временем станет конкурировать с регенерацией РДФ, и скорость фиксации углерода снижается [1], при этом ширина кривых индукции как отмечалось ранее, увеличится. Влияние «внешних» триоз на кривые индукции противоположное из-за действия фосфатного транслокатора. Увеличение концентрации «внешних» триоз вызовет выход неорганического фосфата из хлоропласта в обмен на ТФ, что повлечет за собой увеличение количества триоз, идущих на восстановление РДФ. Это приведет к увеличению скорости фиксации CO_2 и сужению ширины кривых индукции.

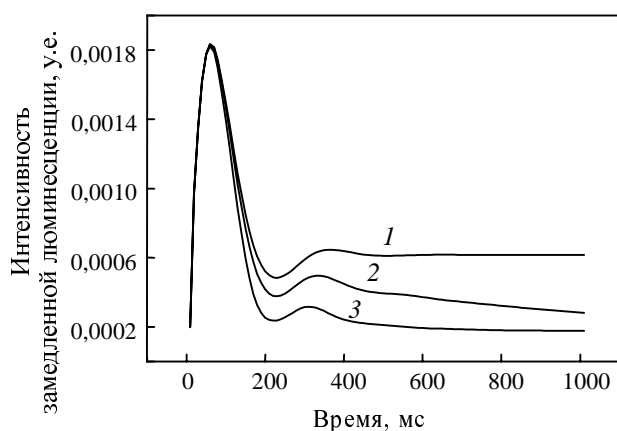


Рис. 3. Кривые индукции замедленной люминесценции при различных константах скорости образования фосфата α в цикле Кальвина:

$\alpha = 1$ (1), $\alpha = 1,3$ (2), $\alpha = 2$ (3)

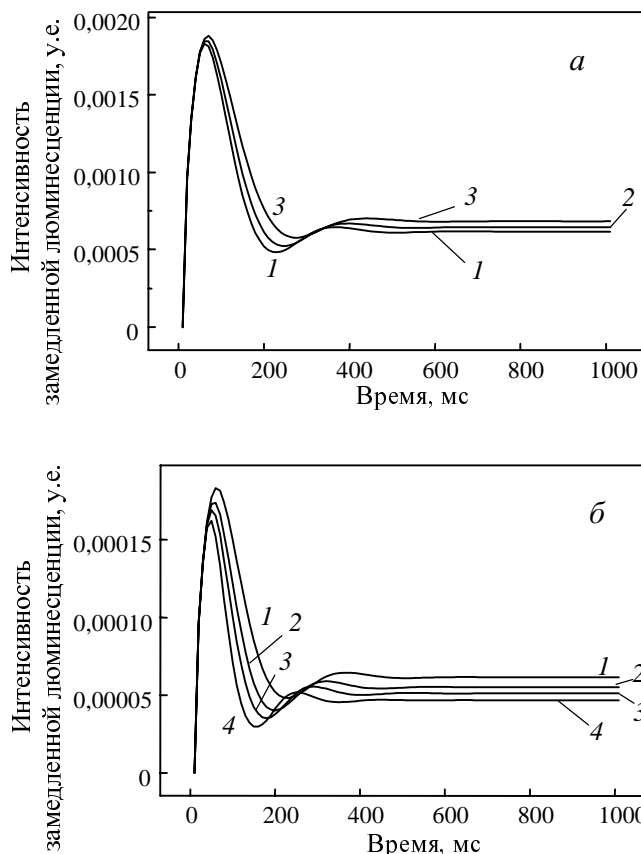


Рис. 4. Кривые индукции замедленной люминесценции при различных начальных концентрациях «внешнего» фосфата $\tau_{13}(0)$ (а) и «внешних» триоз $\tau_{14}(0)$ (б):

на рис. а: $\tau_{13}(0) = 1$ (1), $\tau_{13}(0) = 10$ (2), $\tau_{13}(0) = 20$ (3);
на рис. б: $\tau_{14}(0) = 0$ (1), $\tau_{14}(0) = 0,5$ (2), $\tau_{14}(0) = 3$ (3),
 $\tau_{14}(0) = 8$ (4). Значения концентраций указаны в отн. ед.

Исследование регуляторной роли синтеза крахмала

Влияние скорости синтеза крахмала на кинетику изменения концентрации НАДФН, изученное с помощью модели, включающей в явном виде синтез крахмала из ТФ (см. схему на рис. 2), демонстрируют кривые индукции концентрации НАДФН, представленные на рис. 5. Как было отмечено ранее, начало спада кривых индукции совпадает с началом фиксации CO_2 , поэтому по ширине кривых индукции можно судить о скорости поступления углерода в цикл Кальвина. Из расчетов следует, что с ростом скорости синтеза крахмала ширина кривых индукции увеличивается. Это можно объяснить тем, что по мере интенсификации синтеза крахмала все меньшая доля ТФ поступает в цикл Кальвина на регенерацию РДФ, стационарная скорость фиксации CO_2 достигается за более длительный период и ширина кривых индукции увеличивается.

Выше упоминалось, что накопление крахмала линейно зависит от активности фермента АДФГазы, который активируется ФГК и ингибируется Φ_n . Нами были рассчитаны стационарные концентрации метаболитов цикла Кальвина и стационарная концентрация крахмала при изменении начальной концентрации «внешнего» фосфата с учетом зависимости скорости синтеза крахмала от количественного соотно-

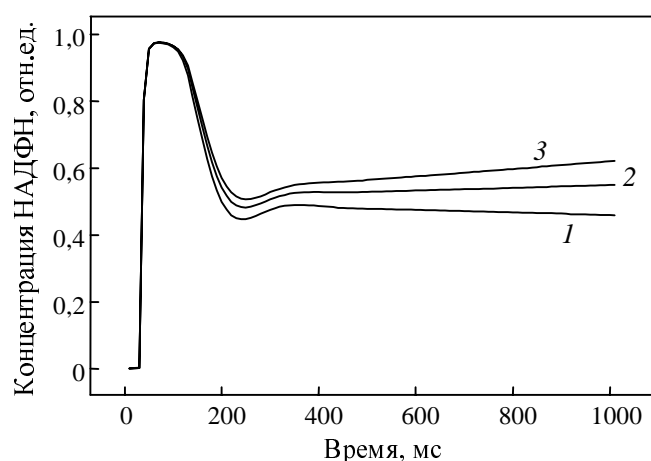


Рис. 5. Кинетическая кривая накопления НАДФН при различных константах скорости синтеза крахмала:

$k_1 = 0,05$ (1), $k_1 = 0,9$ (2), $k_1 = 1,5$ (3)

шения $[\text{ФГК}]/[\text{Ф}_\text{н}]$. Для расчета зависимостей был выбран режим с недостатком фосфата. При этом условии стационарная концентрация крахмала с ростом начальной концентрации фосфата плавно уменьшается (рис. 6). Получившийся результат можно объяснить тем, что с ростом начальной концентрации «внешнего» фосфата уровень ФГК в хлоропласте снижается, а концентрация «внутреннего» фосфата $[\text{Ф}_\text{н}]$ растет, следовательно, соотношение $[\text{ФГК}]/[\text{Ф}_\text{н}]$ уменьшается, а фермент АДФГазы инактивируется, и синтез крахмала замедляется.

Таким образом, с помощью математической модели показано, что изменение выхода неорганического фосфата из цикла Кальвина, вариация концентраций фосфата и триоз в цитозоле влияют на индукцию кривых фотосинтеза в непрерывном и импульсном свете. Благодаря введению в модель синтеза крахмала, яв-

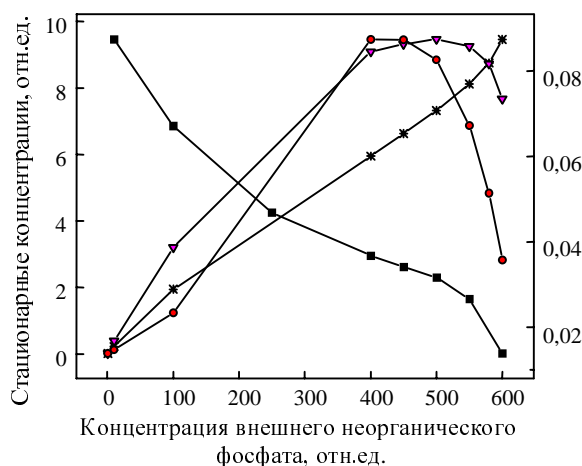


Рис. 6. Зависимость стационарных концентраций ДФГК, крахмала, внешних триоз и внутреннего ортофосфата от концентрации внешнего фосфата с учетом соотношения $[\text{ФГК}]/[\text{Ф}_\text{н}]$ в синтезе крахмала:

● — ДФГК; ■ — крахмал; * — внешние триозы; ▼ — внутренний ортофосфат

ляющегося важнейшим процессом метаболизма фосфата и запасаения углерода, стало возможным исследование влияния скорости синтеза крахмала на индукционные процессы фотосинтеза. Однако модель не включает образования сахарозы, являющейся основным резервным веществом, транспортируемым по проводящим тканям растения. Поэтому для более полного исследования процессов запасаения и транспорта углерода в фотосинтезирующей клетке модель требуется дополнить.

Экспериментальное исследование индукции замедленной люминесценции листьев высших растений

Влияние накопления крахмала на кинетику индукции замедленной люминесценции

Содержание крахмала в листьях влияет на кинетику замедленной люминесценции листьев, так что процессы накопления резервных веществ связаны с эффективностью фотосинтеза, т.е. со скоростью поглощения CO_2 в цикле Кальвина [31]. Изменять содержание крахмала в листьях можно, используя семена с мутациями в генах, отвечающих за синтез крахмала. В работе [42] было показано, что в листьях мутантов гороха с уменьшенным содержанием крахмала в семенах содержится меньше крахмала, чем в листьях дикого типа. Было исследовано влияние уменьшенного содержания крахмала в листьях двойного мутанта с мутациями в генах, отвечающих за фермент, разветвляющий структуру крахмала, и за АДФГазу на период индукции замедленной люминесценции. Однако полученный в этой работе результат увеличения периода полуспада кривых индукции люминесценции у мутанта по сравнению с диким типом не позволяет понять, какой именно процесс ответственен за эффект.

В нашей работе были получены кривые индукции замедленной люминесценции листьев одиночных мутантов гороха trRbRb и RRtrbrb и листьев дикого типа RRRbRb . Как показывает рис. 7, период полуспада (или ширина) кривых индукции больше в случае мутантов RRtrbrb , чем у дикого типа. Что касается мутанта trRbRb и дикого типа, то в пределах ошибки разницы в ширине индукционных кривых не было выявлено.

Измерения периода полуспада кривых индукции замедленной люминесценции листьев мутантов гороха и гороха дикого типа в зависимости от возраста листьев (для измерений было взято от 5 до 11 пар листьев первых трех ярусов мутантов и дикого типа) (см. таблицу) подтверждают полученную разницу во времени полуспада кривых индукции люминесценции мутанта RRtrbrb и дикого типа, несмотря на достаточно большие стандартные отклонения от среднего значения. Возможно, что такие большие различия между результатами измерений обусловлены влиянием газового состава окружающей атмосферы, температуры и влажности, которые могли изменяться в ходе экспериментов. Помимо этого существует разница в фотосинтезе между различными листьями [50].

Таким образом, можно сделать вывод, что на период полуспада индукционных кривых замедленной люминесценции оказывают влияние лишь мутации гена, отвечающего за активность фермента АДФГазы. Уменьшение активности этого фермента вызывает ингибирование реакции образования АДФ-глюкозы с

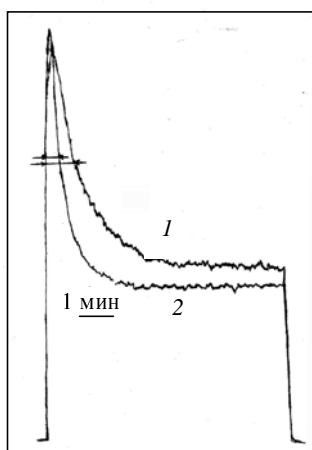


Рис. 7. Кривые индукции замедленной люминесценции листьев гороха (*Pisum sativum*) мутантов RRrbrb (1) и дикого типа RRRbRb (2)

выходом двух молекул фосфата, что приводит к недостатку неорганического фосфата внутри хлоропласта. В свою очередь нехватка фосфата в строме приводит к подавлению фотосинтеза [51], т.е. к уменьшению скорости фиксации CO₂ и увеличению периода индукции фотосинтеза. Подтверждением гипотезы о том, что редуцированное накопление крахмала посредством недостатка фосфата в строме увеличивает период индукции фотосинтеза, могут служить теоретические расчеты индукции замедленной люминесценции в зависимости от скорости выхода неорганического фосфата из цикла Кальвина (см. рис. 3).

Влияние оттока сахарозы из листьев высших растений на кинетику индукции замедленной люминесценции

В работе [52], выполненной с использованием мутантов табака с уменьшенной транспортной активностью ТФТ, было исследовано влияние снижения скорости синтеза сахарозы на скорость электронного транспорта путем измерения флуоресценции хлорофилла *a*. Однако, как было отмечено ранее, влияние переноса сахарозы по целому растению на скорость электронного транспорта остается не изученным.

Нами были проведены опыты по исследованию влияния скорости оттока сахарозы из листьев китай-

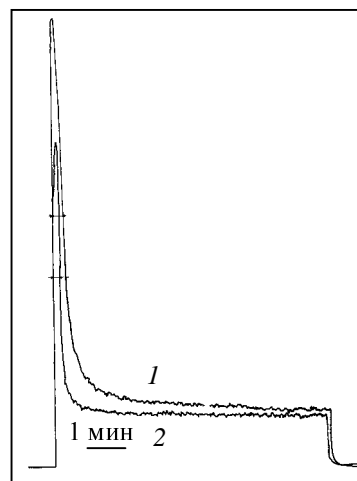


Рис. 8. Кривые индукции замедленной люминесценции листа узумбарской фиалки (*Senpolia*) без охлаждения черешка листа (20 °С) (1) и после 2 ч охлаждения черешка листа на свету (0 °С) (2)

ской розы (*Hibiscus rosa chinensis*) и узумбарской фиалки (*Senpolia*) на период полуспада индукционных кривых замедленной люминесценции. Транспорт сахарозы из листьев ограничивали путем охлаждения черешков листьев [53—55], а также введением в черешки растворов ингибиторов транспорта сахарозы — флоридина и *n*-хлормеркурбензоата [56].

На рис. 8 представлены кривые индукции замедленной люминесценции листа узумбарской фиалки без охлаждения черешка и после охлаждения черешка листа на свету в течение 2 ч. Видно, что ширина кривой индукции после охлаждения черешка листа уменьшилась. Этот результат свидетельствует в пользу того, что в листьях узумбарской фиалки за время охлаждения на свету в проводящих тканях растения и в цитоплазме фотосинтезирующих клеток накапливается достаточное количество сахарозы, чтобы повлиять на скорость фотосинтетических процессов и, соответственно, на ширину индукционных кривых замедленной люминесценции. Аналогичный результат был получен при исследовании влияния охлаждения черешка листьев китайской розы.

Таблица

Время полуспада (ширина) $T_{1/2}$ кривых индукции замедленной люминесценции листьев мутанта гороха rrRbRb и RRrbrb и гороха дикого типа (RRRbRb)

Возраст, дни	$\langle T_{1/2} \rangle \pm \sigma$, с		Возраст, дни	$\langle T_{1/2} \rangle \pm \sigma$, с	
	мутант rrRbRb	дикий тип		мутант RRrbrb	дикий тип RRRbRb
20	39,5 ± 14,2	45 ± 10	20	46,0 ± 8,3	30,0 ± 7,6
21	45 ± 11	41 ± 10	23	47,5 ± 15,5	26,0 ± 5,5
22	49 ± 13	44 ± 10	26	50,0 ± 7,0	35,0 ± 10,0
25	60 ± 15	52,5 ± 18,5	29	47,5 ± 6,9	37,6 ± 5,2
			30	45,2 ± 10,1	28,6 ± 6,3

σ — стандартное отклонение.

Полученный экспериментально результат сужения кривых индукции при уменьшении оттока сахарозы из листа согласуется с теоретическими расчетами влияния «внешних» триоз на ширину кривых индукции флуоресценции и замедленной люминесценции (см. рис. 4 б).

В экспериментах с введением в растения ингибиторов переносчика сахарозы получены аналогичные результаты (рис. 9). Измерения показали, что ширина индукционных кривых замедленной люминесценции увеличилась примерно на 40–50% после введения ингибиторов переносчика сахарозы в черешки листьев китайской розы и узумбарской фиалки. Полученный результат можно объяснить тем, что накопление сахарозы в проводящих тканях растения из-за ограничения ее оттока при действии ингибиторов по типу отрицательной обратной связи уменьшает скорость фотосинтеза [48]. В цикле Кальвина производится меньше триозофосфатов, которые участвуют в синтезе сахарозы. Уменьшение скорости фотосинтеза отражается на кривых индукции замедленной люминесценции в увеличении периода полуспада кривых.

Такой эффект несколько сильнее выражен в случае действия *n*-хлормеркурбензоата, чем флоридзина. Это согласуется с экспериментами [56] по измерению транспортной активности переносчика сахарозы в мембранных везикулах в присутствии ингибиторов транспорта сахарозы. Так, 0,5 мМ раствор флоридзина уменьшает транспортную активность белка-переносчика примерно на 50%, а 1 мМ раствор *n*-хлормеркурбензоата полностью ингибирует транспорт сахарозы. Возможно поэтому влияние уменьшения оттока сахарозы из листьев более заметно при действии *n*-хлормеркурбензоата, чем в случае флоридзина. Кроме того, эффект уширения индукционных кривых

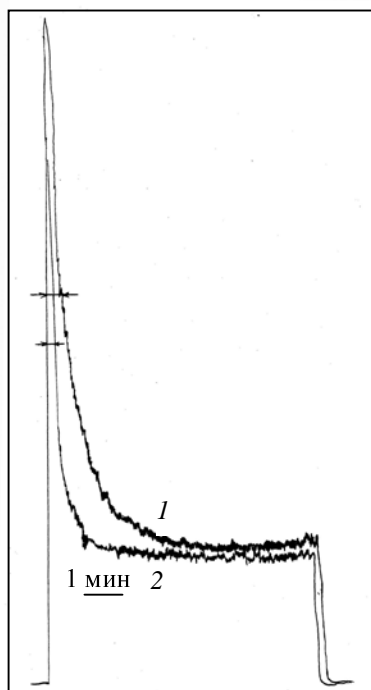


Рис. 9. Кривые индукции замедленной люминесценции листа узумбарской фиалки (*Senpolia*) после введения флоридзина, 0,5 мМ (1) и контрольного объекта (2)

люминесценции при добавлении ингибиторов в небольшой степени зависит от их концентрации. С ростом концентраций период полуспада кривых индукции увеличивается, хотя и незначительно. Вероятно, при действии большего количества ингибиторов транспорт сахарозы подавляется сильнее. Но все же эта зависимость довольно слабая. Возможно, что эффект от увеличения концентрации ингибиторов ограничивается степенью попадания их в черешок листа и, следовательно, степенью связывания ингибитора с белком-переносчиком.

Помимо увеличения периода полуспада индукционных кривых на основании полученных результатов можно сделать заключение, что отношение максимума кривой люминесценции к стационарному ее участку после воздействия испытанных ингибиторов уменьшается, причем за счет роста стационарного уровня интенсивности люминесценции. Увеличение стационарного уровня интенсивности свидетельствует об уменьшении скорости стационарного этапа фотосинтеза.

Таким образом, и рост ширины индукционных кривых замедленной люминесценции, и увеличение интенсивности ее стационарного уровня позволяют сделать вывод, что добавление ингибиторов переносчика сахарозы — флоридзина и *n*-хлормеркурбензоата — вызывает снижение скорости фотосинтеза. Вместе с тем при ограничении оттока сахарозы путем охлаждения черешков листьев был получен противоположный результат — сужение индукционных кривых, т.е. рост скорости фотосинтеза. Разные способы подавления транспорта сахарозы привели в одном случае к увеличению, а в другом — к уменьшению скорости фотосинтеза. Возможно, что в условиях охлаждения транспорт сахарозы замедляется в меньшей степени, чем под действием ингибиторов. В последнем случае сахарозы накапливается недостаточно, чтобы уменьшилась скорость фотосинтеза по типу отрицательной обратной связи. Возросшее при этом количество образовавшихся триозофосфатов может идти на синтез крахмала, для поддержания необходимого количества запасных путей, поскольку транспорт ограничен. Есть данные, что ограничение оттока сахарозы путем охлаждения растения приводит к увеличению содержания углеводов в хлоропластах [53–55]. Возможно и другое объяснение, а именно: при охлаждении черешков листьев транспорт сахарозы ограничивается не так эффективно, как в случае действия ингибиторов. При охлаждении обратимо уменьшается транспортная активность переносчика сахарозы, но он не блокируется и не меняет своего конформационного состояния, как в случае действия ингибиторов [56, 57]. Поэтому возможно, что в случае охлаждения скорость реакций цикла Кальвина возрастает, производится больше триоз для синтеза сахарозы, при увеличении концентрации которой возможно восстановление транспортной активности белка-переносчика.

Косвенным подтверждением данной гипотезы могут служить опыты [58] с введением сахарозы с радиоактивной меткой в листья мутантов арабидопсиса с подавленной генной экспрессией переносчика сахарозы [58]. Несмотря на то, что активность переносчика сахарозы подавлена, радиоактивная метка (из добавленной сахарозы) была найдена в других листьях и акцепторных тканях. Это свидетельствует о том, что переносчик сахарозы либо частично восстановил свою

функцию, либо существуют другие белки-переносчики сахарозы, генная экспрессия которых не была подавлена.

Ингибиторы фактически вызывают инактивацию переносчика сахарозы, и увеличение ее концентрации в результате работы цикла Кальвина приводит только к ее накоплению, а не к возврату транспортной активности переносчика, как это, возможно, происходит в случае охлаждения растения. Предложенные варианты объяснения полученных результатов, несомненно, требуют экспериментального подтверждения.

Выводы

1. С помощью теоретической модели фотосинтеза показано, что благодаря работе триозофосфатного транслокатора изменение концентраций неорганического фосфата и триозофосфата внутри и снаружи хлоропласта, а также накопление крахмала влияет на период полуспада индукционных кривых замедленной люминесценции. Этот результат показывает взаимосвязь первичных процессов фотосинтеза с транспортом и запасанием продуктов фиксации CO₂ и важную роль неорганического фосфата в регуляции метаболизма углерода.

2. Ограничение оттока сахарозы из листьев исследованных растений (китайской розы и узумбарской фиалки) путем их охлаждения или введения ингибиторов транспорта сахарозы в проводящие ткани растений влияет на период полуспада индукционных кривых замедленной люминесценции, причем эффект охлаждения противоположен действию ингибиторов. Вероятно, это свидетельствует о различии в степени подавления переносчика сахарозы: активирование реакций, приводящих в результате к усилению фотосинтеза в случае охлаждения и подавление фотосинтеза при воздействии ингибиторов транспорта сахарозы.

В нашей работе мы попытались показать возможности количественного физико-химического подхода к исследованию кинетических характеристик отдельных этапов и регуляции фотосинтеза растений в целом. Надеемся, что ознакомление с таким подходом будет полезно для специалистов различных специальностей: химикам, физикам, биохимикам и экологам.

* * *

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Эдвардс Дж., Уокер Д. Фотосинтез C₃ и C₄ растений: механизмы и регуляция. М.: Мир, 1986.
2. Stitt M. Biochim. Biophys. Acta, 1980, v. 593, № 1, p. 85.
3. Hausler R. Planta, 1998, v. 204, № 3, p. 366.
4. Шувалов В.А., Климов В.В., Красновский А.А. Молекул. биология, 1976, т. 10, с. 326.
5. Рубин А.Б., Кононенко А.А., Пащенко В.З., Чаморовский С.К., Венедиктов П.С. Итоги науки и техники. Биофизика, ВИНТИ, 1987, т. 12, с. 1.
6. Hall D. e. a. Photosynthesis and Production in a changing environment: a field and laboratory manual. Chapter 12. Published by Chapman and Hall, London, 1933.
7. Гаевский Н.А., Моргунов В.Н. Физиология растений, 1993, т. 40, p. 136.
8. Zaharieva I., Goltsev V. Photochem. Photobiol., 2003, v. 77, № 3, p. 292.
9. Strasser B. Photosyn. Res., 1997, v. 52, p. 147.
10. Cammerer von S. CSIRO Publishing, 2000, p. 165.
11. Walker D., Sivak M. Physiology Vegetale, 1985, v. 23, № 5, p. 829.
12. Flugge U.-L. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1999, v. 50, p. 27.
13. Riesmeier J. Plant Biology, 1993, v. 90, p. 6160.
14. Heldt H. Horizons of Biochemistry and Biophysics, 1976, v. 2, p. 199.
15. Rausch Ch., Bucher M. Planta, 2002, v. 216, p. 23.
16. Stitt M. e. a. The flux of carbon between the chloroplast and cytoplasm. Plant metabolism. Harlow: Longman Press, 1997.
17. Pettersson G., Ryde-Pettersson U. Biomed. Biochem. Acta, 1980, v. 49, p. 723.
18. Ciereszko I. e. a. Planta, 2001, v. 212, p. 598.
19. Woodrow I. Eur. J. Biochemistry, 1983, v. 132, p. 121.
20. Sharkey T. Plant Physiology, 1986, v. 81, p. 1123.
21. Stitt M., Hurry V. Plant Biology, 2002, v. 5, p. 199.
22. Bossis D., Heineke D. Planta, 2001, v. 1, p. 126.
23. Hausler R. Ibid., 2000, v. 210, № 3, p. 383.
24. Martin C. The Plant Cell, 1995, v. 7, p. 971.
25. Press J. Basic Life of Sciences, 1987, v. 41, p. 133.
26. Sweetlove L. Biochem. J., 1996, v. 320, № 2, p. 493.
27. Kleczkowski L. FEBS Lett., 1999, v. 448, p. 153.
28. Haake V. The Plant J., 1998, v. 14, № 2, p. 147.
29. Ludewig F. FEBS Lett., 1998, v. 429, № 2, p. 147.
30. Pettersson G., Ryde-Pettersson. Eur. J. Biochemistry, 1989, v. 179, p. 169.
31. Sun J. e. a. Plant Physiology, 1999, v. 119, p. 267.
32. Tiessen A. e. a. The Plant Cell, 2002, v. 14, p. 2191.
33. Emes M. e. a. J. Experim. Botany, 2003, v. 54, № 382, p. 569.
34. Hedley C. e. a. Annals of Botany, 1994, v. 74, p. 365.
35. Horton P., Nicolson H. Photosyn. Research., 1987, v. 12, p. 129.
36. Pettersson G., Ryde-Pettersson. Eur. J. Biochemistry, 1988, v. 175, p. 661.
37. Laisk A., Walker D. Proc. Roy. Soc. of London, Ser. B, 1986, v. 227, p. 281.
38. Фридлянд Л.Е. Дисс. ... докт. биол. наук, Москва, 1994.
39. Кукушкин А.К. и др. Вестн. МГУ, сер. 36, 1986, т. 33, № 4, с. 60.
40. Караваев В.А., Кукушкин А.К. Биофизика, 1993, т. 38, с. 958.
41. Закирьянов Ф.К., Кукушкин А.К., Солдатова Е.А. Там же, 1994, т. 39, № 4, с. 702.
42. Кузнецова С.А. Дисс. ... канд. физ.-мат. наук, Москва, 2000.
43. Bograheva T. e. a. J. Experim. Botany, 1995, v. 46, № 293, p. 1905.
44. Eichelmann H., Laisk A. Plant Physiol., 1994, v. 106, p. 679.
45. Bukhov N. e. a. Planta, 2002, v. 215, p. 812.
46. Joet T. e. a. Plant Physiol., 2002, v. 128, p. 760.
47. Полевой В.В. Физиология растений. М.: Высшая школа, 1989.
48. Chou T.-J. Plant Biology, 1998, v. 95, p. 4784.
49. Курсанов А.Л. Транспорт ассимилятов в растении. М.: Наука, 1976.
50. Raghavendra A. Photosynthesis. A comprehensive treatise. Cambridge University Press, 1998.
51. Hall D., Rao K. Photosynthesis. Sixth edition. Cambridge University Press, 1999.
52. Hausler R. Planta, 2000, v. 210, № 3, p. 371.
53. Koroleva O. e. a. New Phytology, 1997, v. 136, p. 97.
54. Koroleva O. e. a. Plant Physiology, 1998, v. 118, p. 1525.
55. Koroleva O. e. a. Austral. J. Plant Physiology, 2000, v. 27, p. 747.
56. Bush D. Arch. Biochem. and Biophys., 1993, v. 307, № 2, p. 355.
57. Kuhn Ch. e. a. J. Experim. Botany, 1999, v. 50, p. 935.
58. Gottwald J. e. a. PNAS US, 2000, v. 97, № 25, p. 13979.