

УДК 577.355.582.332

Н.Ф. МИХАЙЛЕНКОИн-т ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,
Украина, 01001, Киев, ул. Терещенковская, 2**ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОЗЫ НА АКТИВНОСТЬ ФОТОСИСТЕМЫ II
SPIRULINA PLATENSIS (NORDST.) GEITL. (CYANOPHYTA)**

Исследовали параметры флуоресценции хлорофилла синезеленой водоросли *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl., росшей в присутствии: а) глюкозы; б) маннозы или 2-дезоксиглюкозы, способных вызывать опосредованную гексокиназным механизмом репрессию фотосинтеза; в) цитрата натрия. Добавление глюкозы сначала приводило к снижению всех параметров фотохимического тушения флуоресценции (F_v/F_m , F_v/F_m' , q_p и $F_{PS II}$), причем степень снижения была пропорциональной концентрации глюкозы. На третьи сутки опыта торможение фотохимической активности ослабевало, вероятно, вследствие утилизации глюкозы клетками. Если концентрация глюкозы в среде культивирования была достаточно высокой (50 мМ), на 7-е сутки все показатели фотохимического тушения снова начинали уменьшаться, причем в этом случае падение q_p было более существенным, чем F_v/F_m' . Необходимым условием для проявления эффекта снижения ингибирующего действия глюкозы было наличие света. Аналоги глюкозы вызывали уменьшение лишь одного из показателей фотохимического тушения – q_p , причем действие 2-дезоксиглюкозы, в отличие от маннозы, было выражено сильнее и не ослабевало до конца эксперимента. Параметры нефотохимического тушения флуоресценции (q_n и NPQ) также снижались под воздействием моносахаридов. Цитрат натрия не оказывал заметного влияния на показатели флуоресценции хлорофилла. Показано, что подавление активности фотосистемы II *S. platensis* глюкозой осуществляется различными путями, причем опосредованный гексокиназой механизм репрессии играет лишь частичную роль и приводит к нарушению оттока электронов из реакционных центров фотосистемы II по электронтранспортной цепи.

Ключевые слова: синезеленые водоросли, *Spirulina platensis*, флуоресценция хлорофилла, глюкоза, манноза, 2-дезоксиглюкоза, цитрат натрия.

Введение

Известно, что низкомолекулярные углеводы, в особенности глюкоза, играют ключевую роль в метаболизме фотосинтезирующей клетки. Эффект репрессии фотосинтеза глюкозой был установлен в первой половине XX в. (Семененко, 1978; Сиваш и др., 2001). Было убедительно продемонстрировано, что сахара, к тому же, могут выступать в роли первичных посредников при передаче регуляторных сигналов геному (Smeekens, 2000; Rolland et al., 2002). Однако, в отличие от специализированных молекул гормонов, сахара оказывают регуляторное воздействие на экспрессию генов в миллимолярных, а не в нано- или микромолярных концентрациях (Jang, Sheen, 1994; Smeekens, 2000).

Одним из фундаментальных механизмов, принимающих участие в передаче глюкозного сигнала, является гексокиназная ферментативная система. Гексокиназа (АТФ : D-гексоза 6-фосфотрансфераза, КФ 2.7.1.1) – фермент, осуществ-

© Н.Ф. Михайленко, 2006

ляющий катализ первой реакции в метаболическом пути утилизации глюкозы (Jang et al., 1997; Harrington, Bush, 2003). Аналоги глюкозы – 2-дезоксиглюкоза и манноза, которые легко фосфорилируются гексокиназой, но практически не включаются в дальнейший метаболизм, – могут вызывать репрессию фотосинтетических генов в концентрации 1-10 мМ (Jang, Sheen, 1994; Pego et al., 2000), в связи с чем широко используются в экспериментальной работе для разграничения метаболического и сигнального эффектов глюкозы.

Механизмы передачи регуляторного сигнала, индуцированного сахарами, достаточно хорошо изучены у бактерий, дрожжей, млекопитающих и высших растений. Однако очень мало сведений о регуляторной роли сахаров в метаболизме синезеленых водорослей, группе прокариотических организмов, способных как к автотрофному (благодаря оксигенному фотосинтезу), так и гетеротрофному (за счет экзогенных источников углерода) росту. Наличие как фотосинтетической, так и дыхательной цепи переноса электронов, которые к тому же имеют несколько общих компонентов – пул пластохинона, комплекс цитохромов b_6f , цитохром c_{553} и/или пластоцианин (Schmetterer, 1994), является уникальной особенностью тилакоидных мембран синезеленых водорослей, в связи с чем можно ожидать возрастания регуляторного потенциала глюкозы – основного субстрата дыхания.

В большинстве современных работ репрессирующее действие глюкозы и ее неметаболизуемых аналогов определяют в основном по накоплению транскриптов мРНК нескольких фотосинтетических генов, например, кодирующих малую субъединицу рибулозобисфосфат-карбоксилазы (*rbcS*) и хлорофилл *a/b*-связывающий белок (*cab*) высших растений (Sheen, 1990; Krapp et al., 1993; Pego et al., 2000), либо полипептиды D1 (*psbA*) и D2 (*psbD*) фотосистемы II синезеленой водоросли *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Лебедева, Семененко, 2000). Однако накопленной к настоящему времени информации явно недостаточно для понимания механизмов воздействия глюкозы на функциональное состояние фотосинтетического аппарата. Доказано, что фотосистема II (ФС II) является наиболее чувствительным к регуляторным сигналам и стрессовым факторам звеном фотосинтетической электронтранспортной цепи (van Rensen, Curwiel, 2000). Было показано, что репрессия фотосинтеза глюкозой в клетках *Chlorella* sp. К приводит, в частности, к подавлению активности ФС II (Зверева и др., 1980). Широкие возможности для оценки состояния ФС II открывает анализ флуоресценции хлорофилла – исключительно быстрый и чувствительный, неинвазивный и информативный метод.

Несмотря на то, что несколько лет назад был предложен протокол измерений параметров флуоресценции хлорофилла у синезеленых водорослей (Campbell et al., 1998), открывшиеся методические возможности до сих пор не используются в сколько-нибудь значительной степени. Таким образом, целью настоящего исследования было изучение воздействия экзогенных органических веществ – глюкозы, ее неметаболизуемых аналогов, а также источника углерода неуглеводной природы (цитрата натрия) – на фотосинтетические характеристики синезеленой водоросли *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. методом анализа флуоресценции хлорофилла.

Материалы и методы

Объектом исследования служила альгологически чистая культура гормониевой синезеленой водоросли *Spirulina platensis*. Водоросли выращивали в стерильных условиях при температуре 27-28 °С в колбах Эрленмейера емкостью 0,75 л на жидкой минеральной среде Заррука (Пиневич и др., 1970) объемом 0,33 л. Культуры освещали люминесцентными лампами ЛБ-40 12 ч в сутки (освещенность на поверхности культур 2,2-2,3 клк; плотность потока квантов фотосинтетически активной радиации 70-75 мкмоль·м⁻²·с⁻¹), перемешивали дважды в сутки. На 15-й день роста в культуры вносили одну из следующих добавок: D-глюкозу (конечная концентрация 5 либо 50 мМ), 2-дезоксид-D-глюкозу, D-маннозу или цитрат натрия (все до конечной концентрации 5 мМ). После внесения добавок водоросли продолжали культивировать в прежних условиях, за исключением того, что часть культур с 50 мМ глюкозой переносили в темноту.

Анализ флуоресценции хлорофилла в клетках *S. platensis* проводили непосредственно перед внесением органических добавок, а также через 1, 2, 3, 4 и 7 суток роста в их присутствии. Концентрацию хлорофилла *a* в культурах водорослей определяли по фон Ветштейну (von Wettstein, 1957), затем суспензии клеток разбавляли средой Заррука до конечной концентрации хлорофилла 2 мкг/мл. Измерения флуоресценции хлорофилла при комнатной температуре проводили с помощью флуориметра ХЕ-РАМ (Heinz Walz GmbH, Германия).

В общих чертах процедура измерений соответствовала описанной в литературе (Campbell et al., 1998). Схема регистрации приведена ниже (рис. 1).

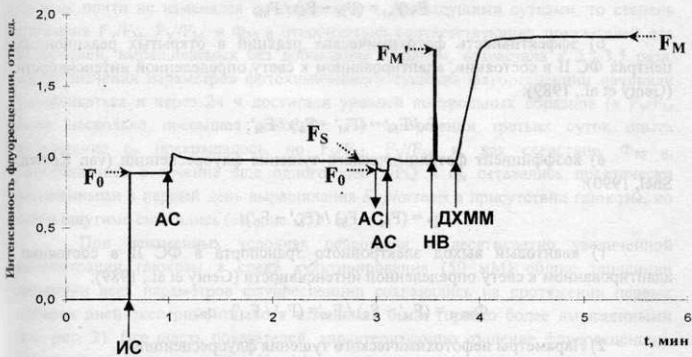


Рис. 1. Типичная кривая эмиссии флуоресценции для определения параметров флуоресценции хлорофилла синезеленых водорослей. ИС — измерительный свет; АС — актиночный свет; НВ — насыщающая вспышка; ДХММ — 3-(3,4-дихлорофенил)-1,1-диметилмочевина; F_0 — минимальный уровень флуоресценции в состоянии, адаптированном к темноте; F_s — стационарный уровень флуоресценции в состоянии, адаптированном к актиночному свету; F_0' — минимальный уровень флуоресценции в состоянии, адаптированном к актиночному свету; F_m' — максимальный уровень флуоресценции в состоянии, адаптированном к актиночному свету; F_m — максимальный уровень флуоресценции.

Перед началом измерений образцы выдерживали в кювете флуориметра в темноте в течение 5 мин. Для определения минимального уровня флуоресценции в состоянии, адаптированном к темноте (F_0), использовали вспышки измерительного света с частотой 2 Гц, достаточно слабые ($0,15 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), чтобы избежать фотохимического разделения зарядов в реакционных центрах ФС II. Далее включали актиничный свет той же интенсивности, что и использовавшийся при культивировании водорослей ($75 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$). В течение 2 мин интенсивность флуоресценции достигала стационарного уровня (F_S). Минимальную флуоресценцию в состоянии, адаптированном к свету (F_0'), измеряли путем кратковременного (5 с) прерывания луча актиничного света, приводившего к окислению электронтранспортной цепи. После возобновления освещения актиничным светом и восстановления уровня флуоресценции F_S подавали вспышку света насыщающей интенсивности ($5000 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, 1 с), что приводило к закрытию всех реакционных центров ФС II и позволяло определить максимальный уровень флуоресценции в состоянии, адаптированном к свету (F_M'). Когда интенсивность флуоресценции возвращалась к уровню F_S , в кювету вносили раствор 3-(3,4-дихлорофенил)-1,1-диметилмочевины (ДХММ) в диметилсульфоксиде (конечная концентрация 5 мкМ) для полного подавления активности ФС II и определения максимальной флуоресценции (F_M).

На основании измеренных относительных значений интенсивности флуоресценции F_0 , F_S , F_0' , F_M' и F_M вычисляли следующие показатели:

1) Параметры фотохимического тушения флуоресценции:

а) максимальная эффективность фотохимических реакций в ФС II:

$$F_V/F_M = (F_M - F_0) / F_M;$$

б) эффективность фотохимических реакций в открытых реакционных центрах ФС II в состоянии, адаптированном к свету определенной интенсивности (Genty et al., 1989):

$$F_V'/F_M' = (F_M' - F_0') / F_M';$$

в) коэффициент фотохимического тушения флуоресценции (van Kooten, Snel, 1990):

$$q_P = (F_M' - F_S) / (F_M' - F_0');$$

г) квантовый выход электронного транспорта в ФС II в состоянии, адаптированном к свету определенной интенсивности (Genty et al., 1989):

$$\Phi_{PS II} = (F_M' - F_S) / F_M' = (F_V' / F_M') \cdot q_P;$$

2) Параметры нефотохимического тушения флуоресценции:

д) коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции (van Kooten, Snel, 1990):

$$q_N = 1 - (F_M' - F_0') / (F_M - F_0) = 1 - F_V' / F_V;$$

е) нефотохимическое тушение флуоресценции по Штерну-Вольмеру (Krause et al., 1982):

$$NPQ = (F_M - F_M') / F_M'.$$

Все представленные на графиках значения являются средними результатами трех независимых экспериментов, в каждом из которых проводилось 3-5 измерений ($n = 9-15$). В качестве погрешностей указаны стандартные отклонения. Для оценки значимости различий использовали метод сравнения средних значений по t -критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0,05$.

Результаты

Параметры фотохимического тушения флуоресценции – F_v/F_m , F_v'/F_m' , q_p и $\Phi_{PS II}$ – существенно не изменялись при фотоавтотрофном росте культуры *S. platensis* (рис. 2). Показатели нефотохимического тушения флуоресценции – q_N и NPQ – начинали возрастать по истечении двух суток эксперимента, однако на седьмой день q_N снижался до того же уровня, что и в начале опыта, в отличие от NPQ, который продолжал увеличиваться.

При добавлении 5 мМ глюкозы в среду культивирования *S. platensis* уже к концу первых суток наблюдалось достоверное уменьшение значений всех параметров, характеризующих интенсивность фотохимических реакций в ФС II (см. рис. 2, а-з). В то время как степень снижения F_v/F_m и F_v'/F_m' по сравнению с контрольными образцами того же возраста была практически одинаковой (на 2,2 и 2,1% соответственно), падение q_p было выражено несколько слабее, а $\Phi_{PS II}$ уменьшался на 3,5%. На второй день эксперимента все четыре показателя фотохимической эффективности снижались до минимальных значений, однако если q_p почти не изменялся по сравнению с предыдущими сутками, то степень снижения F_v/F_m , F_v'/F_m' и $\Phi_{PS II}$ относительно соответствующих показателей для водорослей, выращиваемых без добавления глюкозы, возрастала в 2,5-3,5 раза. Затем значения параметров фотохимического тушения флуоресценции начинали увеличиваться и через 24 ч достигали уровней контрольных образцов (а F_v/F_m даже несколько превышал таковой). По завершении третьих суток опыта возрастание q_p прекращалось, но F_v/F_m , F_v'/F_m' и, как следствие, $\Phi_{PS II}$ увеличивались в течение еще одного дня. NPQ и q_N оставались практически неизменными в первый день выращивания *S. platensis* в присутствии глюкозы, но затем ощутимо снижались (см. рис. 2, д, е).

При неизменных условиях освещения и десятикратно увеличенной концентрации глюкозы в среде культивирования (50 мМ) общие тенденции динамики всех параметров флуоресценции сохранялись на протяжении первых четырех дней эксперимента, хотя изменения были гораздо более выраженными (см. рис. 2). Все шесть показателей, характеризующих тушение флуоресценции, снижались уже в течение 24 ч. Коэффициент q_p уменьшался до того же уровня, что и в случае 5 мМ глюкозы, но снижение F_v/F_m , F_v'/F_m' и $\Phi_{PS II}$ было более существенным (на 5,2; 4,0 и 5,4% соответственно). Спустя еще сутки все параметры фотохимического тушения флуоресценции снижались значительно, хотя q_p , как и в образцах с 5 мМ глюкозой, изменялся в наименьшей степени: он снижался на 10,3% по сравнению с контрольным образцом, тогда как F_v/F_m и F_v'/F_m' – на 29%, а $\Phi_{PS II}$ – на 36%. На протяжении следующих двух дней показатели фотохимической эффективности возрастали – значения q_p фотомиксотрофной и фотоавтотрофной культур совпадали, а остальные параметры

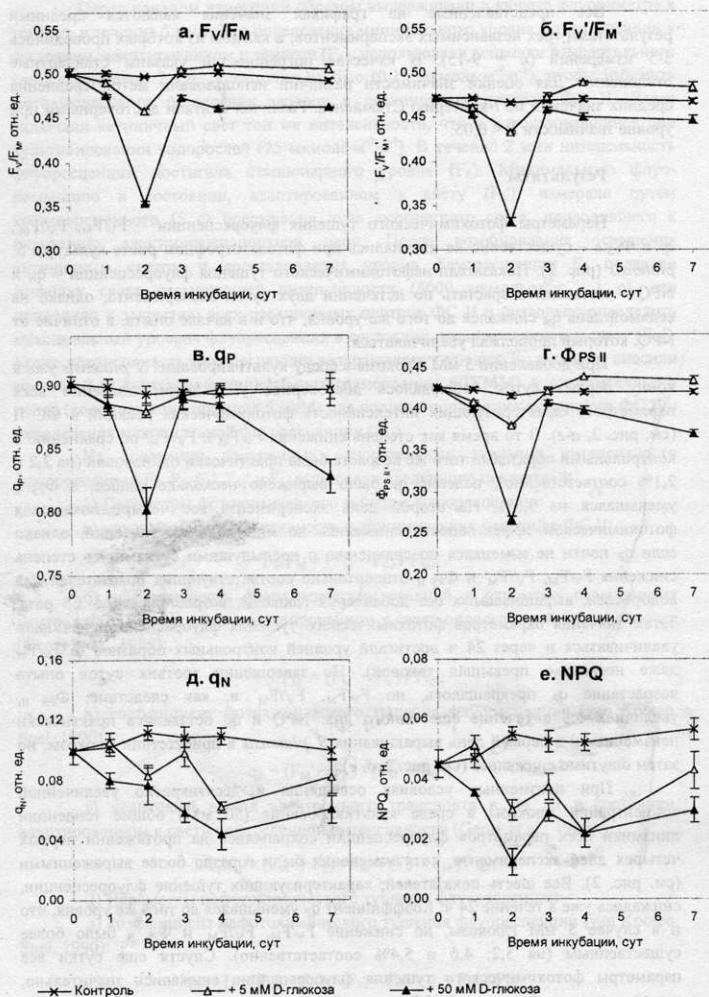


Рис. 2. Динамика изменений параметров флуоресценции хлорофилла в клетках *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl., культивируемых в присутствии 5 либо 50 мМ D-глюкозы при освещении $70-75 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2}\text{с}^{-1}$. В качестве погрешностей указаны стандартные отклонения средних арифметических ($n = 15$).

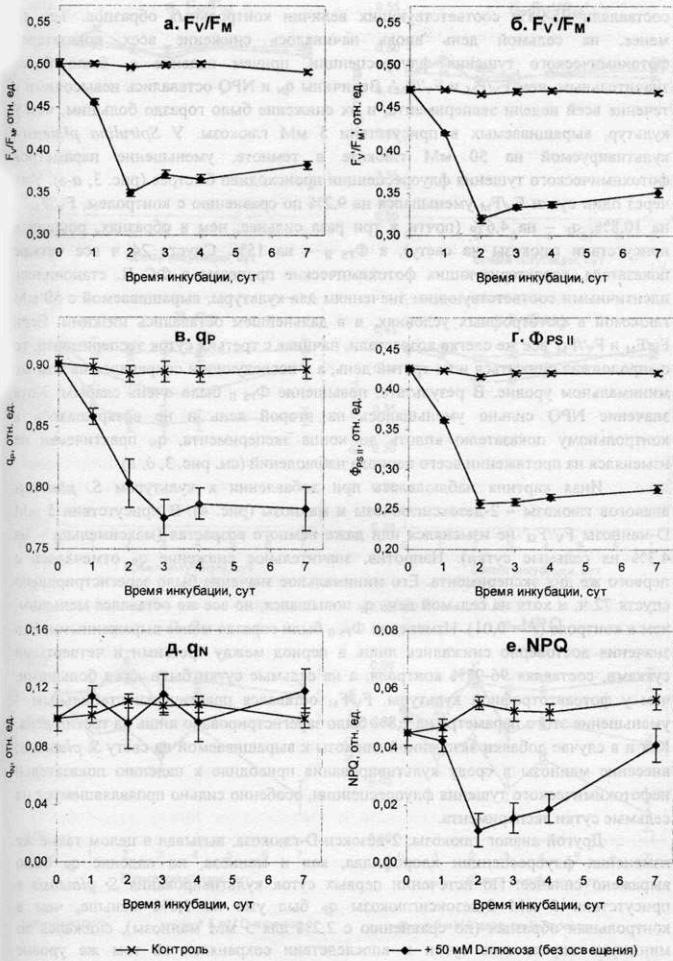


Рис. 3. Динамика изменений параметров флуоресценции хлорофилла в клетках *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl., культивируемых в присутствии 50 мМ D-глюкозы в темноте. В качестве погрешностей указаны стандартные отклонения средних арифметических ($n = 15$ для контрольных образцов и $n = 9$ для образцов, культивируемых с глюкозой в темноте).

составляли 95-98% соответствующих величин контрольных образцов. Тем не менее, на седьмой день вновь начиналось снижение всех показателей фотохимического тушения флуоресценции, причем падение q_p было более значительным, чем F_v/F_m и F_v/F_m' . Величины q_N и NPQ оставались невысокими в течение всей недели эксперимента, и их снижение было гораздо большим, чем у культур, выращиваемых в присутствии 5 мМ глюкозы. У *Spirulina platensis*, культивируемой на 50 мМ глюкозе в темноте, уменьшение параметров фотохимического тушения флуоресценции происходило быстрее (рис. 3, а-з). Уже через одни сутки F_v/F_m уменьшался на 9,2% по сравнению с контролем, F_v/F_m' – на 10,8%, q_p – на 4,6% (почти в три раза сильнее, чем в образцах, росших в присутствии глюкозы на свету), а $\Phi_{PS II}$ – на 15%. Спустя 24 ч все четыре показателя, характеризующих фотохимические процессы в ФС II, становились идентичными соответствующим значениям для культуры, выращиваемой с 50 мМ глюкозой в фототрофных условиях, и в дальнейшем оставались низкими. Если F_v/F_m и F_v/F_m' все же слегка возрастали, начиная с третьих суток эксперимента, то q_p продолжал снижаться и на третий день, а в последующем сохранялся на том же минимальном уровне. В результате, повышение $\Phi_{PS II}$ было очень слабым. Хотя значение NPQ сильно уменьшалось на второй день и не возвращалось к контрольному показателю вплоть до конца эксперимента, q_N практически не изменялся на протяжении всего периода наблюдений (см. рис. 3, д, е).

Иная картина наблюдалась при добавлении к культурам *S. platensis* аналогов глюкозы – 2-дезоксиглюкозы и маннозы (рис. 4). В присутствии 5 мМ D-маннозы F_v/F_m' не изменялся или даже немного возрастал (максимально – на 4,3% на седьмые сутки). Напротив, значительное снижение q_p отмечалось с первого же дня эксперимента. Его минимальное значение было зарегистрировано спустя 72 ч, и хотя на седьмой день q_p повышался, но все же оставался меньшим, чем в контроле ($P = 0,01$). Изменения $\Phi_{PS II}$ были гораздо менее выраженными. Его значения достоверно снижались лишь в период между третьими и четвертыми сутками, составляя 96-97% контроля, а на седьмые сутки были даже большими, чем у фотоавтотрофной культуры. F_v/F_m оставался практически стабильным – уменьшение этого параметра на 2,8% было зарегистрировано лишь на третий день. Как и в случае добавки экзогенной глюкозы к выращиваемой на свету *S. platensis*, внесение маннозы в среду культивирования приводило к падению показателей нефотохимического тушения флуоресценции, особенно сильно проявлявшемуся на седьмые сутки эксперимента.

Другой аналог глюкозы, 2-деокси-D-глюкоза, вызывал в целом такие же изменения флуоресценции хлорофилла, как и манноза, но падение q_p было выражено сильнее. По истечении первых суток культивирования *S. platensis* в присутствии 5 мМ 2-дезоксиглюкозы q_p был уже на 5,6% меньше, чем в контрольных образцах (по сравнению с 2,2% для 5 мМ маннозы), снижался до минимума спустя еще сутки и впоследствии сохранялся на том же уровне (приблизительно 93,5% контрольной величины). Хотя F_v/F_m' оставался неизменным или немного повышался, $\Phi_{PS II}$ снижался уже в первые 24 ч, продолжал падать в последующие два дня и, несмотря на некоторое повышение в дальнейшем, не достигал значений контрольной культуры к концу периода наблюдений. В отличие от маннозы, экзогенная 2-дезоксиглюкоза вызывала достоверное снижение q_N и NPQ лишь на третьи сутки, и это снижение было довольно слабым.

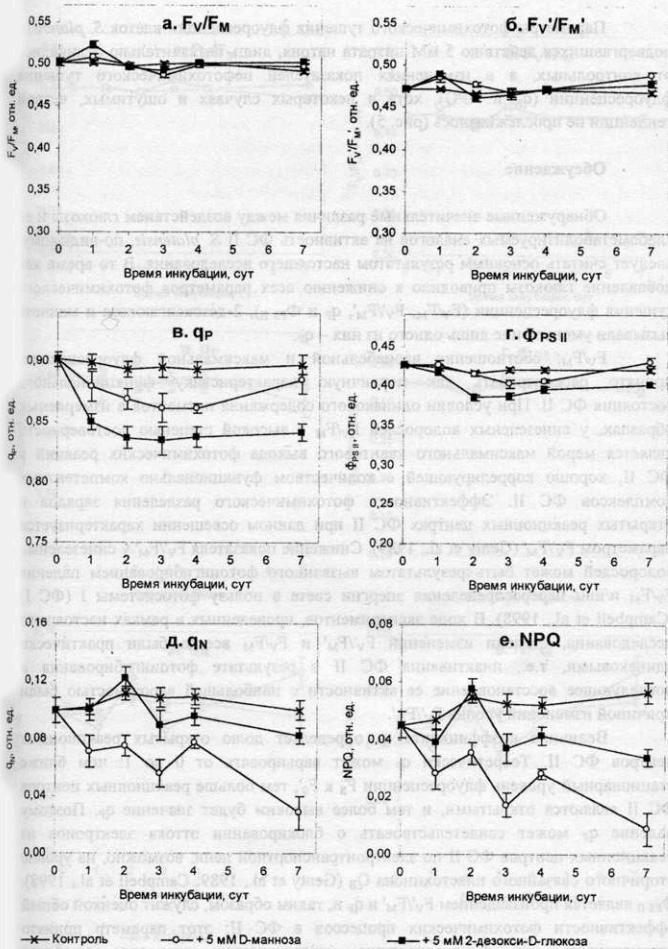


Рис. 4. Динамика изменений параметров флуоресценции хлорофилла в клетках *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl., культивируемых в присутствии аналогов глюкозы, 5 мМ D-маннозы либо 5 мМ 2-деокси-D-глюкозы, при освещении 70-75 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹. В качестве погрешностей указаны стандартные отклонения средних арифметических ($n = 15$).

Параметры фотохимического тушения флуоресценции клеток *S. platensis*, подвергавшихся действию 5 мМ цитрата натрия, лишь незначительно отличались от контрольных, а в изменениях показателей нефотохимического тушения флуоресценции (q_N и NPQ), хотя в некоторых случаях и ощутимых, четкой тенденции не прослеживалось (рис. 5).

Обсуждение

Обнаруженные значительные различия между воздействием глюкозы и ее слабометаболизируемых аналогов на активность ФС II *S. platensis*, по-видимому, следует считать основным результатом настоящего исследования. В то время как добавление глюкозы приводило к снижению всех параметров фотохимического тушения флуоресценции (F_v/F_m , F_v'/F_m' , q_P и $\Phi_{PS II}$), 2-дезоксиглюкоза и манноза вызывали уменьшение лишь одного из них – q_P .

F_v/F_m , соотношение вариабельной и максимальной флуоресценции, принято рассматривать как первичную характеристику функционального состояния ФС II. При условии одинакового содержания пигментов в измеряемых образцах, у синезеленых водорослей F_v/F_m с высокой степенью достоверности является мерой максимального квантового выхода фотохимических реакций в ФС II, хорошо коррелирующей с количеством функционально компетентных комплексов ФС II. Эффективность фотохимического разделения зарядов в открытых реакционных центрах ФС II при данном освещении характеризуется параметром F_v'/F_m' (Genty et al., 1989). Снижение показателя F_v'/F_m' у синезеленых водорослей может быть результатом вызванного фотоингибированием падения F_v/F_m и/или перераспределения энергии света в пользу фотосистемы I (ФС I) (Campbell et al., 1998). В ходе экспериментов, проведенных в рамках настоящего исследования, степени изменений F_v'/F_m' и F_v/F_m всегда были практически одинаковыми, т.е., инактивация ФС II в результате фотоингибирования и последующее восстановление ее активности с наибольшей вероятностью были причиной изменений уровня F_v'/F_m' .

Величина коэффициента q_P определяет долю открытых реакционных центров ФС II. Теоретически q_P может варьировать от 0 до 1: чем ближе стационарный уровень флуоресценции F_S к F_0' , тем больше реакционных центров ФС II являются открытыми, и тем более высоким будет значение q_P . Поэтому падение q_P может свидетельствовать о блокировании оттока электронов из реакционных центров ФС II по электронтранспортной цепи, возможно, на уровне вторичного связанного пластохинона Q_B (Genty et al., 1989; Campbell et al., 1998). $\Phi_{PS II}$ является произведением F_v'/F_m' и q_P и, таким образом, служит оценкой общей эффективности фотохимических процессов в ФС II; этот параметр принято рассматривать как флуоресцентную характеристику скорости линейного электронного транспорта.

Исходя из вычисленных показателей флуоресценции хлорофилла, интенсивность подавления глюкозой активности ФС II *S. platensis* в первые два дня эксперимента зависела от концентрации глюкозы. F_v/F_m и F_v'/F_m' подвергались влиянию глюкозы в большей степени, чем q_P . На третьи сутки воздействия экзогенной глюкозы, вероятно, происходила некая перестройка метаболизма водорослей, приводившая к активному ее потреблению клетками.

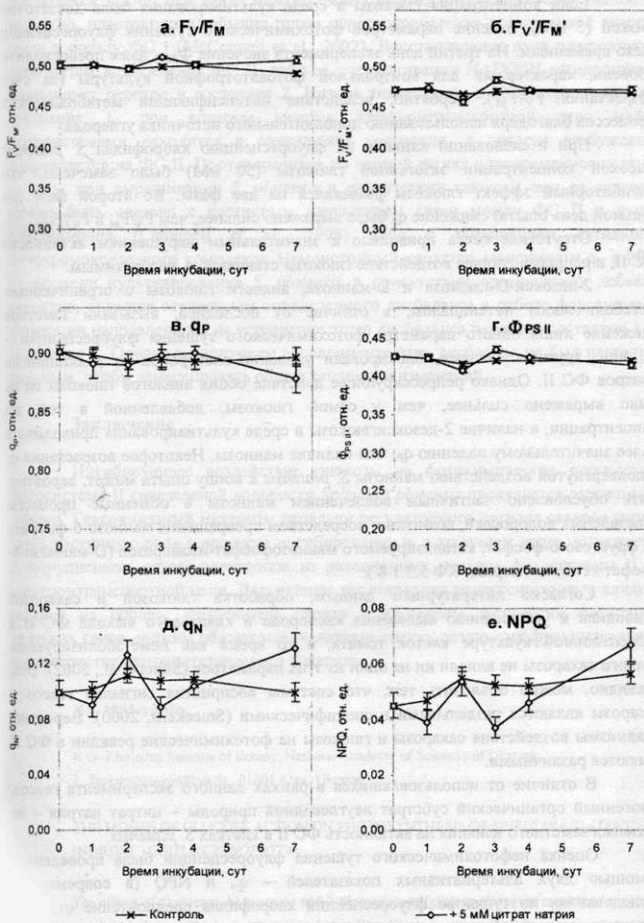


Рис. 5. Динамика изменений параметров флуоресценции хлорофилла в клетках *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl., культивируемых в присутствии 5 мМ цитрата натрия при освещении 70-75 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹. В качестве погрешностей указаны стандартные отклонения средних арифметических ($n = 15$ для контрольных образцов и $n = 12$ для образцов, культивируемых с цитратом натрия).

Если концентрация глюкозы в среде культивирования была достаточно низкой (5 мМ), падение параметров фотохимического тушения флуоресценции было временным. На третий день эксперимента значение Φ_{PSII} даже превосходило уровень, характерный для контрольной фотоавтотрофной культуры (за счет возрастания F_v/F_m), вероятно, вследствие интенсификации метаболических процессов благодаря использованию дополнительного источника углерода.

При исследовании влияния на флуоресценцию хлорофилла *S. platensis* высокой концентрации экзогенной глюкозы (50 мМ) было замечено, что ингибиторный эффект глюкозы разделялся на две фазы. Во второй фазе (на седьмой день опыта) снижение q_p было выражено сильнее, чем F_v/F_m и F_v/F_m' .

Отсутствие света приводило к значительным нарушениям активности ФС II, и репрессирующее воздействие глюкозы становилось необратимым.

2-дезоксид-D-глюкоза и D-манноза, аналоги глюкозы с ограниченным метаболическим потенциалом, в отличие от последней, вызывали заметное снижение лишь одного параметра фотохимического тушения флуоресценции – q_p , или, другими словами, блокировали удаление электронов из реакционных центров ФС II. Однако репрессирующее действие обоих аналогов глюкозы на q_p было выражено сильнее, чем у самой глюкозы, добавленной в той же концентрации, а наличие 2-дезоксиглюкозы в среде культивирования приводило к более значительному падению q_p , чем наличие маннозы. Некоторое возрастание q_p у подвергнутой воздействию маннозы *S. platensis* к концу опыта может, вероятно, быть обусловлено частичным вовлечением маннозы в обменные процессы синезеленых водорослей, возможно, посредством превращения маннозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат, катализируемого маннозофосфат-изомеразой (D-маннозо-6-фосфат кетол-изомеразы, КФ 5.3.1.8.).

Согласно литературным данным, обработка глюкозой и сахарозой приводила к уменьшению выделения кислорода и квантового выхода ФС II в суспензионной культуре клеток томата, в то время как неметаболизируемые аналоги сахарозы не влияли ни на один из этих параметров (Sinha et al., 2002). Это, очевидно, можно объяснить тем, что системы восприятия сигналов гексоз и сахарозы являются отдельными и специфическими (Smeekens, 2000). Вероятно, механизмы воздействия сахарозы и глюкозы на фотохимические реакции в ФС II являются различными.

В отличие от использовавшихся в рамках данного эксперимента гексоз, экзогенный органический субстрат неуглеводной природы – цитрат натрия – не оказывал заметного влияния на активность ФС II в клетках *S. platensis*.

Оценка нефотохимического тушения флуоресценции была проведена с помощью двух альтернативных показателей – q_N и NPQ (в современных исследованиях по тушению флуоресценции хлорофилла предпочтение отдается последнему, поскольку его вычисление не требует определения F_0 и F_0' и, следовательно, он менее подвержен искажениям). У высших растений основными процессами, вносящими вклад в нефотохимическое тушение флуоресценции, являются тепловое рассеяние энергии и формирование транстилакоидного градиента pH (Horton et al., 1996). Напротив, у синезеленых водорослей изменения нефотохимического тушения флуоресценции обусловлены главным образом переходом состояния 1 ↔ состояние 2, который регулирует распределение энергии возбуждения между ФС II и ФС I (Campbell et al., 1998). Состояние 1

достигается за счет окисления межсистемных переносчиков электронов (наиболее вероятно, пластохинона) обычно путем перераспределения поглощенной энергии света в пользу ФС I (McConnell et al., 2002). Восстановление пула пластохинона либо путем возбуждения ФС II, либо за счет активации NAD(P)H-дегидрогеназы инициирует переход в состояние 2. Низкие значения q_N и NPQ характерны для состояния 1, при котором участок электронтранспортной цепи между фотосистемами находится в окисленном состоянии, а энергия возбуждения направляется на ФС II. Противоречивое на первый взгляд одновременное падение q_P и q_N при выращивании *S. platensis* в присутствии глюкозы или ее аналогов может быть связано с частичным нарушением связи между ФС II и пулом пластохинона (Campbell et al., 1998) либо с повышением активности цитохромоксидазного комплекса. Немонотонный характер зависимости q_N и NPQ от времени культивирования *S. platensis* в присутствии органических добавок, вероятно, является отражением определенного дисбаланса в работе фотосистем и активации направленного на устранение этого дисбаланса перехода состояние 1 ↔ состояние 2. Однако в настоящем эксперименте этот дисбаланс не был настолько сильным, чтобы замаскировать общие тенденции изменений.

Заключение

Ингибирующее воздействие глюкозы на фотохимические процессы в фотосистеме II синезеленой водоросли *Spirulina platensis* проявляется различными путями. Гексокиназный механизм передачи регуляторного сигнала сахаров играет лишь частичную роль в процессе ингибирования и, в конечном итоге, выражается в затрудненном оттоке электронов из реакционных центров фотосистемы II по электронтранспортной цепи. Дальнейшие исследования репрессирующего влияния сахаров на процесс фотосинтеза наряду с изучением экспрессии фотосинтетических генов должны обязательно включать оценку различных функциональных характеристик фотосинтетического аппарата.

N. F. Mykhaylenko

N.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine,
2, Tereshchenkovskaya St., 01001 Kiev, Ukraine

THE MODES OF GLUCOSE ACTION ON PHOTOSYNTHESIS OF *SPIRULINA PLATENSIS* (NORDST.) GEITL. (CYANOPHYTA)

The effects of a) glucose, b) mannose and 2-deoxyglucose (glucose analogues capable of triggering hexokinase-mediated photosynthesis repression) and c) sodium citrate on chlorophyll fluorescence parameters of the blue-green alga *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. were investigated. The addition of glucose evoked, at first, the lowering of all photochemical fluorescence quenching parameters (F_v/F_m , F_v/F_m' , q_P and $\Phi_{PS II}$). The decrease correlated with glucose concentration. The inhibition of photochemical activity relaxed on third day of the experiment, perhaps, as the consequence of glucose utilization. If the concentration of glucose in the cultural medium was high enough (50 mM), on the seventh day all the indices of photochemical quenching began to diminish again, at which time q_P reduction was more significant than that for F_v/F_m' . The relief of glucose repressive effects was light-dependent. Glucose analogues caused the decrease in only one

photochemical quenching parameter, q_p . Unlike mannose, the effect of 2-deoxyglucose was more pronounced and did not weaken till the end of experiments. Nonphotochemical fluorescence quenching parameters (q_n and NPQ) were also reduced under monosaccharide treatment. The influence of sodium citrate on chlorophyll fluorescence parameters was negligible. Therefore, the multiplicity of glucose effects in the course of inhibition of *S. platensis* Photosystem II activity was demonstrated, while hexokinase-dependent repression mechanism was playing only a partial role and resulting in the blocking of electron flow from Photosystem II reaction centers down the electron transport chain.

К е у о р д с : blue-green algae, *Spirulina platensis*, chlorophyll fluorescence, glucose, mannose, 2-deoxyglucose, sodium citrate.

- Зверева М.Г., Климова Л.А., Семенов В.Е. Репрессия синтеза РНК и нарушение активности фотохимических систем хлоропласта при действии 2-дезоксид-Д-глюкозы и гипертрофированном накоплении ассимилятов в клетках хлореллы // Физиол. раст. – 1980. – 27, № 6. – С. 1218-1228.
- Лебедева Н.В., Семенов В.Е. Регуляция фотосинтеза глюкозой и ее стереохимическим аналогом у цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Там же. – 2000. – 47, № 5. – С. 662-667.
- Пиневич В.В., Верзилин Н.Н., Михайлов А.А. Изучение *Spirulina platensis* – нового объекта для высокоинтенсивного культивирования // Там же. – 1970. – 17, № 5. – С. 1037-1046.
- Семенов В.Е. Молекулярно-биологические аспекты эндогенной регуляции фотосинтеза // Там же. – 1978. – 25, № 5. – С. 903-921.
- Сиваш О.О., Михайленко Н.Ф., Золотарьова О.К. Цукри як ключова ланка в регуляції метаболізму фотосинтезуючих клітин // Укр. бот. журн. – 2001. – 58, № 1. – С. 121-127.
- Campbell D., Hurry V., Clarke A.K., Gustafsson P., Öquist G. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1998. – 62, N 3. – P. 667-683.
- Genty B., Briantais J.M., Baker N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – 990, N 1. – P. 87-92.
- Harrington G.N., Bush D.R. The bifunctional role of hexokinase in metabolism and glucose signaling // Plant Cell. – 2003. – 15, N 11. – P. 2493-2496.
- Horton P., Ruban A.V., Walters R.G. Regulation of light harvesting in green plants // An. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1996. – 47. – P. 655-684.
- Jang J.-C., Sheen J. Sugar sensing in higher plants // Plant Cell. – 1994. – 6, N 11. – P. 1665-1679.
- Jang J.-C., León P., Zhou L., Sheen J. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants // Ibid. – 1997. – 9, N 1. – P. 5-19.
- Krapp A., Hofmann B., Schäfer C., Stitt M. Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: A mechanism for the 'sink regulation' of photosynthesis? // Plant J. – 1993. – 3, N 6. – P. 817-828.
- Krause G.H., Verrotte C., Briantais J.-M. Photoinduced quenching of chlorophyll fluorescence in intact chloroplasts and algae. Resolution into two components // Biochim. Biophys. Acta. – 1982. – 679, N 1. – P. 116-124.
- McConnell M.D., Koop R., Vasil'ev S., Bruce D. Regulation of the distribution of chlorophyll and phycobilin-absorbed excitation energy in cyanobacteria. A structure-based model for the light state transition // Plant Physiol. – 2002. – 130, N 3. – P. 1201-1212.
- Pego J.V., Korstee A.J., Huijser C., Smeekens S.C.M. Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression // J. Exp. Bot. – 2000. – 51, N 2. – P. 407-416.

- Rolland F., Moore B., Sheen J.* Sugar sensing and signaling in plants // *Plant Cell.* – 2002. – 14, Suppl. 1. – P. 185-205.
- Schmetterer G.* Cyanobacterial respiration // *The molecular biology of cyanobacteria.* – Dordrecht, etc.: Kluwer Acad. Publ., 1994. – P. 409-435.
- Sheen J.* Metabolic repression of transcription in higher plants // *Plant Cell.* – 1990. – 2, N 10. – P. 1027-1038.
- Sinha A.K., Hofmann M.G., Römer U., Köckenberger W., Elling L., Roitsch T.* Metabolizable and non-metabolizable sugars activate different signal transduction pathways in tomato // *Plant Physiol.* – 2002. – 128, N 4. – P. 1480-1489.
- Smeekees S.* Sugar-induced signal transduction in plants // *An. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 2000. – 51. – P. 49-81.
- van Kooten O., Snel J.F.H.* The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology // *Photosynth. Res.* – 1990. – 25, N 3. – P. 147-150.
- van Rensen J.J., Curwiel V.B.* Multiple functions of photosystem II // *Ind. J. Biochem. Biophys.* – 2000 – 37, N 6. – P. 377-382.
- van Wettstein D.* Chlorophyll lethals and submicroscopic morphological changes in plastids // *Exp. Cell Res.* – 1957. – 12, N 3. – P. 427-506.

Получена 15.06.05

Подписала в печать Е.И. Шнюкова