

На правах рукописи

Долгополова Анастасия Александровна

**ФИКСАЦИЯ УГЛЕРОДА, НАКОПЛЕНИЕ КРАХМАЛА, ТРАНСПОРТ САХАРОЗЫ
И НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФАТА И ПЕРВИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ
ФОТОСИНТЕЗА**

Специальность 03.00.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук.

МОСКВА 2004

Работа выполнена на кафедре биофизики физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Научный руководитель:

доктор физико-математических наук,
профессор

Кукушкин
Александр Константинович

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук,
профессор

Караваев
Владимир Александрович

кандидат физико-математических наук
старший научный сотрудник

Птицын
Григорий Анатольевич

Ведущая организация:

Институт Физиологии Растений им. Тимирязева РАН

Защита диссертации состоится «20» мая 2004 г. в ___ час. ___ мин. на заседании Диссертационного совета К 501.001.08 при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В.Ломоносова, Физический факультет, аудитория ___

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «__» _____ 2004 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета К 501.001.08

кандидат физико-математических наук

Г.Б. Хомутов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Фотосинтез является процессом, в ходе которого происходит превращение световой энергии в энергию химических связей. Выделяющийся в ходе фотосинтеза кислород является важнейшим веществом для поддержания жизни на Земле. Поэтому изучение фотосинтеза и возможных механизмов регуляции эффективности усвоения углерода имеет большое значение. Взаимосвязь различных реакций фотосинтеза обеспечивает жизнедеятельность растения в изменяющихся условиях. Изучение регуляторных связей позволяет выводить растения, приспособленные к резким изменениям климата, содержащие различное количество сахаров и других веществ, а также позволяет создавать условия, благоприятные для оптимального роста и развития растения. В настоящее время известно молекулярное строение основных компонентов фотосинтетического аппарата, фотохимические и биохимические реакции фотосинтеза. Однако механизмы взаимодействия между ними и способы регуляции остаются неизученными.

Взаимодействие световых и темновых реакций фотосинтеза особенно ярко проявляется в процессах индукции, когда происходит переход адаптированного к темноте растения к стационарному фотосинтезу после включения возбуждающего света. Индукция объясняется несколькими причинами, в том числе активацией ферментов цикла Кальвина, которая зависит от концентраций метаболитов цикла Кальвина и запасных веществ, а также от энергетического потенциала клетки. На практике для исследования индукционных процессов часто используют флуоресцентные методы, в том числе быструю флуоресценцию и замедленную люминесценцию. Поскольку световые стадии фотосинтеза через цепь электронного транспорта связаны с темновыми реакциями ассимиляции углерода, то характеристики люминесценции зависят не только от состояния светособирающих пигментов и компонентов цепи электронного транспорта, но и от биохимических процессов, происходящих в цикле Кальвина. В связи с этим большой интерес представляет изучение влияния транспорта и запасания продуктов ассимиляции углерода на первичные процессы фотосинтеза.

Также как и другие процессы метаболизма, ассимиляция углерода при фотосинтезе подвержена контролю и регуляции. Регуляция осуществляется посредством изменения активности ферментов, как правило, катализирующих необратимые реакции; а также изменением концентраций метаболитов по закону действующих масс и транспортом метаболитов между хлоропластом и окружающей его клеточной средой. Наиболее важным в жизнедеятельности растительной клетки является обмен неорганического фосфата с триозофосфатом, осуществляемый триозофосфатным транслокатором. Работа

этого белка подвержена регуляции концентрацией фосфата внутри и снаружи хлоропласта и определяет, какая часть фиксированного углерода будет участвовать в восстановительной фазе цикла Кальвина, какая часть пойдет на синтез крахмала, а какая часть будет транспортироваться из клетки и превращаться в сахарозу.

Синтез крахмала в хлоропластах также регулируется концентрацией неорганического фосфата. Важную роль в этом процессе играет фермент АДФглюкозопирофосфорилаза, от активности которого зависит скорость синтеза крахмала. Содержание крахмала в хлоропластах растительных клеток влияет на эффективность фиксации углерода и на первичные реакции фотосинтеза. В частности, замедление синтеза крахмала может приводить к активации циклического транспорта, исследование которого позволяет более детально изучить процессы переноса электронов и механизмы регуляции активности ФС2. Большую помощь в исследовании регуляторной роли синтеза крахмала оказывает использование мутантов с мутациями в генах, отвечающих за активность АДФглюкозопирофосфорилазы, и имеющих недостаток крахмала в семенах.

Помимо перечисленных способов контроля эффективности ассимиляции углерода на уровне клетки существует регуляция посредством изменения скорости переноса питательных веществ по целому растению. Определяющее значение здесь занимает транспорт сахарозы из листьев. Сахароза играет важную роль в регуляции фотосинтеза. Низкое содержание сахаров приводит к стимуляции фиксации CO_2 , деградации крахмала и усиленному транспорту сахаров. Избыток сахаров стимулирует рост растения и накопление запасных веществ.

Цель данной работы заключается в исследовании влияния метаболизма и транспорта продуктов ассимиляции CO_2 на первичные процессы фотосинтеза.

Для достижения этой цели поставлено ряд задач.

1. С помощью теоретической модели фотосинтеза провести исследование влияния транспорта неорганического фосфата и триоз, а также накопления крахмала на кинетические характеристики кривых индукции флуоресценции и замедленной люминесценции.
2. Измерить содержание крахмала в листьях мутантов гороха с недостатком крахмала в семенах.
3. Измерить скорость поглощения CO_2 листьями мутантов и дикого типа.
4. Экспериментально исследовать влияние недостатка крахмала на параметры индукционных кривых фотосинтеза.

5. Провести исследование влияния недостатка крахмала на активацию циклического транспорта электронов вокруг ФС1 при различных температурах и добавлении сахаров и ингибиторов циклического транспорта.
6. Экспериментально исследовать влияние оттока сахарозы, ограничиваемого охлаждением проводящих тканей или введением ингибиторов транспорта сахарозы, на параметры индукционных кривых замедленной люминесценции.

Новизна работы.

Впервые в теоретическую модель фотосинтеза был включен синтез крахмала в явном виде и исследовано влияние скорости накопления крахмала на индукционные кривые фотосинтеза.

Проведено исследование влияния недостатка крахмала в семенах гороха на скорость поглощения CO_2 .

Установлено влияние недостатка крахмала в листьях гороха на активацию циклического транспорта электронов вокруг ФС1.

Обнаружено влияние оттока сахарозы из листьев высших растений, ограничиваемого с помощью охлаждения проводящих тканей растений или введением ингибиторов транспорта сахарозы, на период полуспада кривых индукции замедленной люминесценции.

Практическая ценность работы.

Представленные в диссертационной работе результаты показывают взаимосвязь первичных процессов фотосинтеза с транспортом и запасанием продуктов фиксации CO_2 и важную роль неорганического фосфата для регуляции метаболизма углерода.

Разработанная в данной работе теоретическая модель может использоваться для анализа экспериментальных данных по исследованию влияния недостатка крахмала в листьях на параметры индукционных кривых замедленной люминесценции.

Исследование циклического транспорта, проведенное в данной работе, имеет большое значение для понимания причин, приводящих к его активации.

Подход, используемый в данной работе, может быть использован для мониторинга физиологического состояния растений, а полученные результаты могут применяться в экологических исследованиях.

Ценность полученных данных обусловлена их вкладом в понимание механизмов регуляции активности цикла Кальвина транспортом и запасанием продуктов фиксации CO_2 и взаимосвязи первичных и вторичных процессов фотосинтеза.

Апробация работы. Основные результаты работы были доложены на 8 научных конференциях, в том числе на конференции “Горизонты физико-химической биологии” (Пушино, 2000 г.), на 2-й международной конференции “Фундаментальные проблемы физики” (Саратов, 2000 г.), на 16-м международном симпозиуме по Биоэнергетике в Словакии (Братислава, 2001 г.), а также на международных конференциях студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов» (Москва, 1999-2002 гг.) и на научной конференции «Ломоносовские чтения» (Москва, 2002 г.).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 12 печатных работ, в том числе 4 статьи.

Структура диссертации. Работа состоит из введения, обзора литературы с постановкой задачи, описания методик теоретических расчетов и экспериментов, описания результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация включает 109 страниц текста, 41 рисунок и 13 таблиц. Список литературы содержит 145 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы диссертации и сформулирована цель работы.

Глава I представляет собой литературный обзор. В **разделе I.1.** обосновано измерение газообмена листьев и его связь с кинетикой фермента РуБисКО. Введено понятие кривых зависимости скорости поглощения CO_2 от внутриклеточной концентрации CO_2 (A-Ci-кривых) и CO_2 компенсационной точки, а также описан пример их применения для исследования фотосинтеза мутантов табака с недостатком крахмала. **Раздел I.2.** посвящен определению индукции фотосинтеза, рассмотрению причин ее возникновения и факторов, влияющих на индукционный период. В **разделе I.3.** описаны методы исследования индукции фотосинтеза: метод индукции флуоресценции и замедленной люминесценции. Рассмотрены возможности их применения для изучения процессов поглощения света, разделения зарядов, электронного транспорта, а также для изучения процессов транспорта и накопления продуктов ассимиляции CO_2 . В **разделе I.4.** приведены литературные данные о том, что обмен неорганического фосфата и триозофосфата между стромой и цитозолем осуществляется посредством триозофосфатного переносчика, находящегося в мембране хлоропласта. Рассмотрена регуляция активности этого белка концентрациями фосфата внутри и снаружи хлоропласта, а также важная роль триозофосфатного транслокатора в регуляции активности ассимиляции углерода. В **разделе I.5.** описывается влияние содержания

неорганического фосфата в хлоропласте и в цитозоле на скорость фиксации CO_2 и показана важная роль неорганического фосфата в ее регуляции. В **разделе I.6.** приведены реакции синтеза крахмала в хлоропластах, рассмотрена регуляция активности ключевого фермента синтеза крахмала АДФглюкозопирофосфорилазы, описаны факторы, влияющие на скорость синтеза крахмала, и роль синтеза крахмала в регуляции фиксации CO_2 . Кроме этого, уделено внимание синтезу крахмала в семенах и описаны мутанты гороха с мутациями, затрагивающими гены, ответственные за накопление крахмала в семенах. **Раздел I.7.** посвящен обсуждению причин, приводящих к активации циклического транспорта электронов вокруг ФС1. Рассмотрены два пути циклического потока электронов и дыхание в хлоропластах, происходящее в темноте с участием НАДФН-дегидрогеназы, которая осуществляет перенос электронов от НАДФН на пул пластохинонов. Большое внимание уделено анализу факторов, влияющих на активность циклического транспорта электронов. В **разделе I.8.** рассматриваются методы, с помощью которых можно исследовать циклический транспорт электронов вокруг ФС1. **Пункт I.8.1.** посвящен методу термолюминесценции. Особое внимание уделено описанию пика АГ или «послесвечения», который является индикатором циклического потока электронов. Рассмотрены факторы, влияющие на его появление, форму и положение. В **пункте I.8.2.** показано, что по стационарному значению величины поглощения фотоокисленных центров P700^+ и по скорости восстановления P700^+ в темноте после выключения дальнего красного света можно судить об активности циклического потока электронов вокруг ФС1. В **разделе I.9.** приведены реакции синтеза сахарозы и возможные механизмы регуляции содержания сахарозы. Рассматривается транспорт сахарозы из листьев, факторы, влияющие на его активность и роль транспорта сахарозы в регуляции скорости фотосинтеза. В **разделе I.9.1.** обсуждается применение различных веществ для ограничения транспорта сахарозы. В **разделе I.10.** описываются некоторые теоретические модели фотосинтеза. Особое внимание уделялось моделям, содержащим не только первичные процессы фотосинтеза, но и реакции цикла Кальвина, а также синтез крахмала и сахарозы. В **разделе I.11.** приведена постановка задачи.

Глава II посвящена описанию методик теоретических расчетов и экспериментов. В **разделе II.1.** приводится описание теоретических моделей, с помощью которых проводились расчеты кинетики флуоресценции, замедленной люминесценции и интенсивности НАДФН. Первая модель была разработана ранее на кафедре биофизики и включает поглощение и перенос возбуждения в антеннах ФС1 и ФС2, перенос энергии к реакционным центрам, разделение зарядов в реакционных центрах, перенос электронов

между фотосистемами, циклический транспорт вокруг ФС1, фотофосфорилирование, основные реакции цикла Кальвина с выходом фосфата. Кроме того, она учитывает реакции переноса неорганического фосфата и триозофосфата посредством триозофосфатного транслокатора. Данная модель удовлетворительно описывает кривые индукции флуоресценции и замедленной люминесценции, а также позволяет исследовать влияние неорганического фосфата на их параметры.

Для исследования влияния синтеза крахмала на индукцию фотосинтеза нами была разработана модель, полученная из предыдущей добавлением реакции синтеза крахмала. Схема реакций, включенных в модель, представлена на рисунке 1.

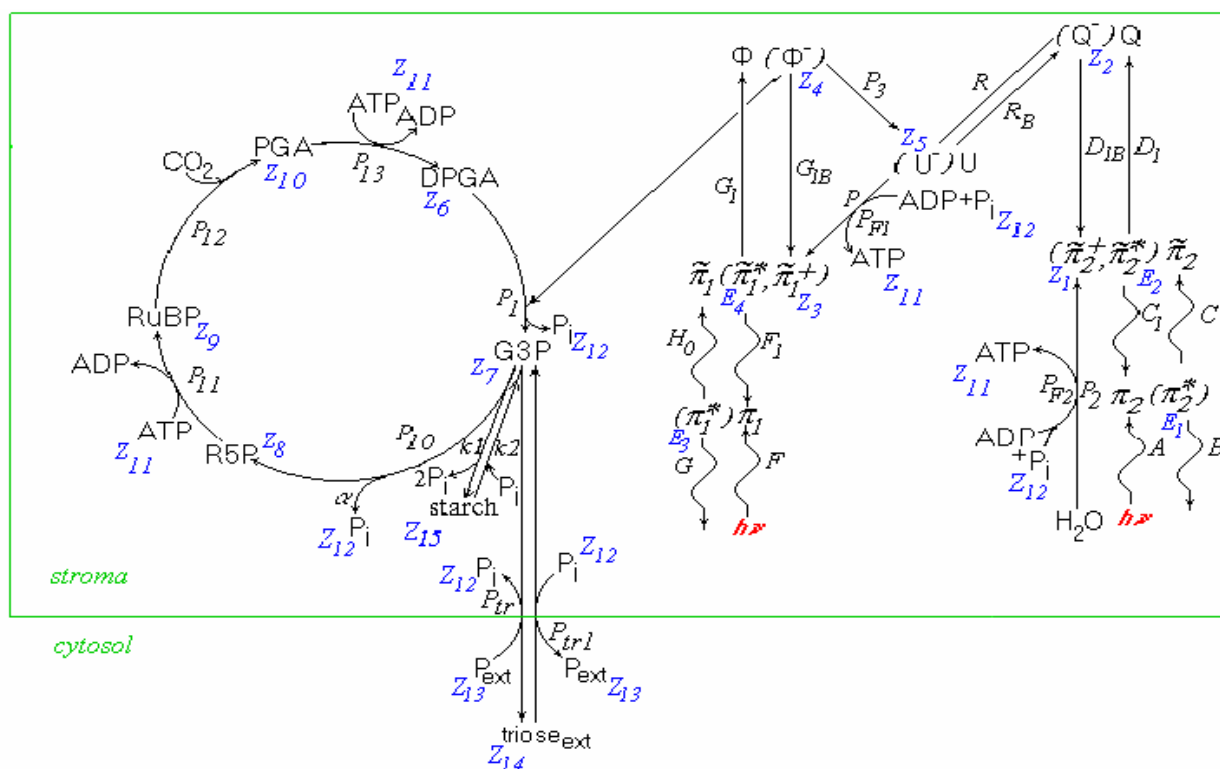


Рисунок 1. Схема процессов, учитываемых в модели. π_1, π_2 – пигменты антенны, $\tilde{\pi}_1, \tilde{\pi}_2$ – реакционные центры ФС1 и ФС2, Q, U, Φ – электронные переносчики, P_{F1}, P_{F2} – коэффициенты сопряжения между реакциями электронного транспорта и синтезом АТФ, α – коэффициент сопряжения скорости обращения цикла Кальвина с выходом фосфата, P_i – неорганический фосфат, P_{ext} – внешний неорганический фосфат, $triose_{ext}$ – внешний триозофосфат.

Синтез крахмала учтен в модели в виде реакции превращения глицеральдегида-3-фосфата (G3P) с константой скорости k_1 в крахмал с выходом двух молекул неорганического фосфата. Также учитывается деградация крахмала в обратной реакции образования глицеральдегида-3-фосфата с константой скорости k_2 из крахмала с участием неорганического фосфата.

В разделе II.2. описан метод регистрации кривых индукции миллисекундной замедленной люминесценции. Замедленная люминесценция измерялась с помощью

фосфороскопа, который, вращаясь, разделяет во времени возбуждение образца и регистрацию люминесценции. В разделе **II.3.** приведена методика измерения содержания крахмала в листьях и оценка концентрации крахмала в листьях на единицу массы. **Раздел II.4.** посвящен описанию метода измерения газообмена листьев с помощью измерительной системы Li-Cog-6400. В частности, описывается принцип расчета скорости фотосинтеза, устьичной проводимости и внутриклеточной концентрации CO₂. **Раздел II.5.** посвящен описанию метода измерения окислительно-восстановительного состояния P700. Окислительно-восстановительное состояние реакционного центра ФС1 P700 контролируется посредством регистрации изменений в поглощении образцом дальнего красного света примерно на 820 нм с помощью эмиттера-детектора ED-P700DW и стандартного импульсного амплитудо-модулирующего флуориметра РАМ-флуориметра (Walz, Effeltrich, Germany). В **разделе II.6.** описывается метод регистрации кривых термолюминесценции. Принцип регистрации термолюминесценции сходен с методикой измерения замедленной люминесценции, но требует не только измерения свечения листа, но и регуляции температуры листа, допускающей быстрое охлаждение и постепенное нагревание объекта. Изменение температуры осуществляется с помощью термоэлектрической пластинки Пельтье. В **разделе II.7.** рассмотрена методика инфильтрации ингибиторов и сахаров. В **разделе II.8.** перечислены объекты исследований и условия их выращивания.

В **главе III** представлены результаты и их обсуждение. В **разделе III.1.** с помощью теоретической модели исследуется влияние метаболизма неорганического фосфата на время полуспада кривых индукции при непрерывном и импульсном освещении. В данной модели фосфат расходуется на фотофосфорилирование, выделяется при восстановленииДФГК, а также образуется с коэффициентом α на выходе продукта X, обозначающего пул С3-С7 сахаров, идущих на синтез сахарозы и крахмала. В зависимости от коэффициента α изменяется выход фосфата из цикла Кальвина. Расчеты показали, что с увеличением α время полуспада кривых индукции флуоресценции, замедленной люминесценции и НАДФН уменьшается. Это можно объяснить тем, что при увеличении α на выходе продукта X образуется больше фосфата, следовательно, быстрее восстанавливается количество АТФ. Поэтому увеличивается скорость АТФ-зависимых реакций, т. е. возрастает скорость фиксации углерода. Следовательно, спад флуоресценции происходит быстрее.

Неорганический фосфат может переноситься через мембрану хлоропласта в обмен на триозофосфат благодаря работе триозофосфатного транслокатора. Триозофосфатный

транслокатор – это белок переносчик, находящийся в мембране хлоропласта, активность которого регулируется концентрацией неорганического фосфата. С помощью теоретической модели в данной работе исследовалось влияние роста концентрации внешнего фосфата на время полуспада индукционных кривых флуоресценции, НАДФН и замедленной люминесценции. В частности, на рисунке 2 представлены кривые индукции замедленной люминесценции при различных начальных концентрациях внешнего неорганического фосфата.

Расчеты показали, что с увеличением концентрации внешнего фосфата ширина кривых индукции увеличивается. Рост концентрации внешнего фосфата активирует триозофосфатный транслокатор, что приводит к транспорту триозофосфатов в цитозоль. Однако их экспорт со временем станет конкурировать с регенерацией РуБФ, и скорость фиксации углерода упадет, а ширина или время полуспада кривых индукции увеличится.

Благодаря работе фосфатного транслокатора влияние внешних триоз на время полуспада кривых индукции будет противоположным действию неорганического фосфата. Действительно, на рисунке 3 представлены кривые индукции замедленной люминесценции при различных начальных концентрациях внешнего триозофосфата.

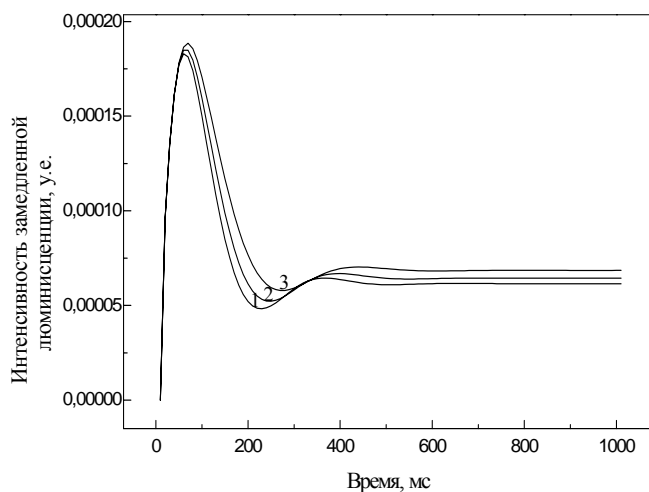


Рисунок 2. Индукция замедленной люминесценции при различных концентрациях внешнего фосфата: $z_{13}(0)=1$ (1), $z_{13}(0)=10$ (2), $z_{13}(0)=20$ (3).

Из рисунка видно, что с ростом концентрации внешних триоз время полуспада индукционных кривых замедленной люминесценции уменьшается. Объяснить полученный результат можно тем, что увеличение концентрации внешних триоз влечет за собой выход неорганического фосфата из хлоропласта в обмен на триозофосфат (ТФ), что приведет к росту количества триоз, идущих на восстановление РубФ.

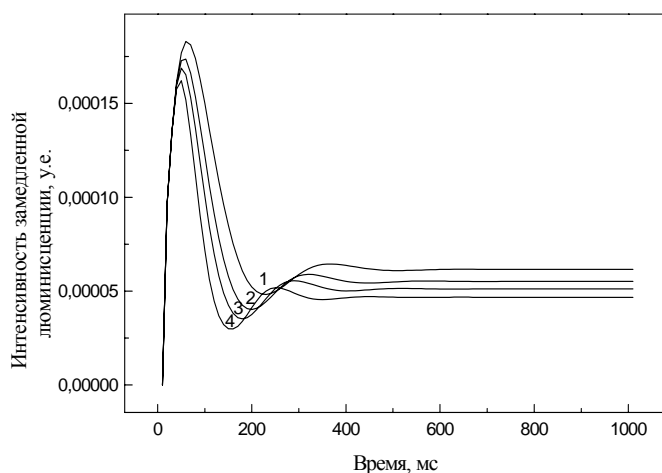


Рисунок 3. Индукция замедленной люминесценции при различных концентрациях внешних триоз: $z_{14}(0)=0$ (1), $z_{14}(0)=0.5$ (2), $z_{14}(0)=3$ (3), $z_{14}(0)=8$ (4).

Это вызовет увеличение скорости фиксации CO_2 и, следовательно, сужение кривых индукции.

В разделе III.2. представлены результаты расчетов влияния накопления крахмала на время полуспада кривых индукции флуоресценции и НАДФН, полученные с помощью модели, включающей в явном виде синтез крахмала. Расчеты показали, что с ростом константы скорости синтеза крахмала ширина или время полуспада кривых индукции увеличивается. Полученный результат свидетельствует о том, что с ростом константы скорости синтеза крахмала все меньшая доля триозофосфатов поступает в цикл Кальвина на регенерацию РубФ, следовательно, стационарная скорость фиксации CO_2 достигается медленнее, и ширина кривых индукции увеличивается.

Теоретическая модель фотосинтеза, включающая в явном виде синтез крахмала, также использовалась для расчета стационарных концентраций основных метаболитов цикла Кальвина и концентрации крахмала в зависимости от внешней концентрации неорганического фосфата (Φ_n). Расчеты проводились в режиме с недостатком фосфата, чтобы система была более чувствительной к изменениям концентрации внешнего фосфата. Результаты расчетов показали, что концентрация ФГК уменьшается, концентрации ГЗФ, АТФ и РубФ фактически не изменяются, концентрацияДФГК, крахмала и внешних триоз возрастают, но при очень большой концентрации внешнего фосфата можно заметить резкое изменение стационарных уровней метаболитов цикла Кальвина. Это можно объяснить тем, что при докритической концентрации внешнего

фосфата система успешно перерабатывает фосфат, который идет на образование АТФ, расходуется в цикле Кальвина и через фосфатный переносчик обменивается на ТФ. При критической концентрации внешнего фосфата ТФ начинают быстро выходить в цитозоль и частично включаться в синтез крахмала. Поэтому уменьшаются концентрации метаболитов цикла Кальвина таких, как РубФ, ФГК и ДФГК, а концентрации внешних триоз и крахмала растут. Ортофосфат из хлоропласта фактически не выходит, а идет на синтез АТФ, поскольку активно экспортируются ТФ. Расход АТФ в реакциях восстановления РубФ и ДФГК уменьшается, поскольку уменьшились концентрации субстратов в этих реакциях. Включение внутреннего неорганического фосфата в синтез АТФ и ее замедленный расход в реакциях цикла Кальвина приводит к росту стационарной концентрации АТФ. АТФ образуется быстрее, чем идет ее расходование, из-за этого падает концентрация веществ в АТФ-зависимых реакциях, а ГЗФ выходит в цитозоль на образование сахарозы.

Учет зависимости скорости синтеза крахмала от отношения $\text{ФГК}/\text{Ф}_n$ приводит к тому, что стационарная концентрация крахмала с ростом начальной внешней концентрации фосфата незначительно убывает. Получившийся результат можно объяснить тем, что с ростом начальной концентрации внешнего фосфата концентрация ФГК в хлоропласте уменьшается, а концентрация внутреннего неорганического фосфата растет, следовательно, отношение $[\text{ФГК}]/[\text{Ф}_n]$ убывает, а фермент АДФглюкозопирофосфорилаза инактивируется, поскольку он аллостерически регулируется этим отношением, и синтез крахмала замедляется. Изменения концентраций метаболитов цикла Кальвина имеют такой же характер, как в случае без зависимости константы скорости синтеза крахмала от отношения $[\text{ФГК}]/[\text{Ф}_n]$, но в отличие от предыдущего случая резких скачков концентраций интермедиатов цикла Кальвина не наблюдается. Это свидетельствует о том, что учет контроля синтеза крахмала отношением $[\text{ФГК}]/[\text{Ф}_n]$ сделал систему более устойчивой к изменению начальной концентрации внешнего фосфата. Объяснить это можно тем, что с ростом начальной концентрации внешнего фосфата отношение $[\text{ФГК}]/[\text{Ф}_n]$ падает, следовательно, уменьшается уровень крахмала в хлоропласте и синтез метаболитов цикла Кальвина происходит более эффективно.

Раздел III.3. посвящен исследованию мутантов гороха (*Pisum sativum*) с недостатком крахмала в семенах. В работе были использованы два одиночных мутанта с мутациями в генах *r*, отвечающих за фермент, участвующий в разветвлении крахмала, и в генах *rb*, отвечающих за активность фермента АДФглюкозопирофосфорилазы. Также

эксперименты выполнялись на двойных мутантах с мутациями и в генах *r*, и в генах *rb*. Наличие указанных мутаций приводит к уменьшению содержания крахмала в семенах примерно на 75% сухого веса. Дикий тип RRRbRb гороха использовался в качестве контроля. В пункте III.3.1. представлены результаты измерений, показывающих изменение содержания крахмала в листьях одиночных мутантов гороха с недостатком крахмала в семенах. Результаты экспериментов показали, что уровень крахмала в листьях мутантов ниже, чем в листьях дикого типа примерно на 30% – 50%. В пределах ошибки разницы в содержании крахмала между двумя мутантами не выявлено. Кроме того, можно заметить, что концентрация крахмала и в листьях мутантов, и в листьях дикого типа растет с приближением темного времени суток. Этот результат согласуется с литературными данными о том, что крахмал в листьях высших растений синтезируется и накапливается в течение дня и расходуется ночью. Полученная разница в содержании крахмала в листьях дикого типа и мутантов гороха свидетельствует о том, что мутации в семенах в генах, отвечающих за фермент, который участвует в разветвлении крахмала, и в генах, отвечающих за АДФГазу, подавляют накопление крахмала в листьях. В пункте III.3.2. представлены результаты измерений фотосинтеза листьев гороха дикого типа и мутантов. Методом газообмена (“gas exchange method”) была измерена скорость поглощения CO₂ листьями двойного мутанта (*rrrbrb*) и листьями дикого типа (RRRbRb) гороха (*Pisum sativum*) в зависимости от концентрации CO₂ в окружающей лист атмосфере. Растения были разделены на две группы в зависимости от возраста: в первую вошли растения мутантов и дикого типа с возрастом от 16 до 19 дней, во вторую – от 22 до 28 дней. Полученные А-С_i-кривые зависимости скорости поглощения CO₂ от внутриклеточной концентрации CO₂ для двух групп растений представлены на рисунках 4 и 5.

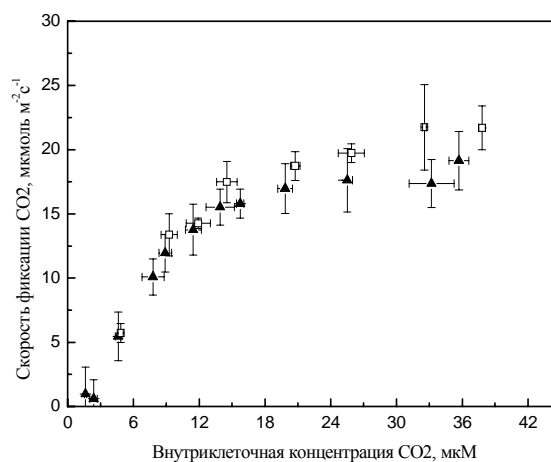
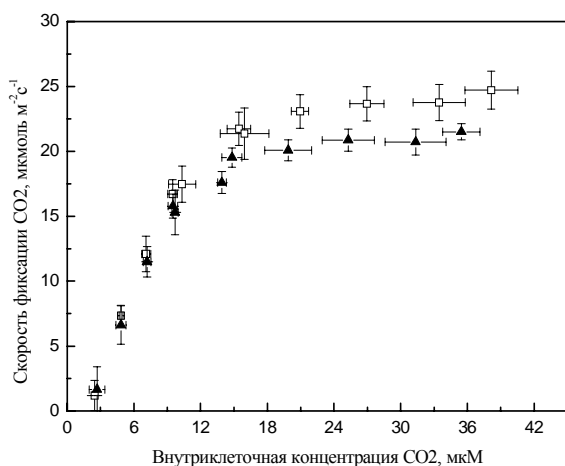


Рисунок 4. Зависимость скорости поглощения CO_2 от внутриклеточной концентрации CO_2 листьев 16-19-дневных растений гороха (\square) дикого типа RRRbRb и (\blacktriangle) двойного мутанта rrrbrb.

Рисунок 5. Зависимость скорости поглощения CO_2 от внутриклеточной концентрации CO_2 листьев 22-28-дневных растений гороха (\square) дикого типа RRRbRb и (\blacktriangle) двойного мутанта rrrbrb.

По рисункам можно определить, что CO_2 компенсационная точка составляет $2,2 \pm 0,5$ мкМ и для растений мутантов, и для дикого типа. Такое значение CO_2 компенсационной точки является общим для всех СЗ-растений. Кривые зависимости скорости поглощения CO_2 от внутриклеточной концентрации CO_2 для мутантов и дикого типа на начальном этапе совпадают и носят линейный характер примерно до 12 мкМ CO_2 внутри клеток, затем скорость ассимиляции CO_2 выходит на горизонтальное плато. В этой части А-Сi-кривых наблюдается различие между диким типом и мутантами по величине скорости фиксации CO_2 при больших внутриклеточных концентрациях CO_2 . Из рисунков видно, что максимальная скорость поглощения CO_2 для дикого типа выше, чем для мутантов. Кроме того, можно заметить, что максимальная скорость поглощения CO_2 меньше для более зрелых растений, как дикого типа гороха, так и мутантов. Полученный результат свидетельствует о том, что скорость фотосинтеза при больших внутриклеточных концентрациях CO_2 убывает по мере созревания листа. Объяснить такую зависимость скорости фиксации CO_2 от возраста листьев можно тем, что зрелому листу не требуется дополнительного количества углерода для роста. Помимо разницы в максимальной скорости фиксации CO_2 между двумя группами растений обнаружено различие в первоначальном наклоне А-Сi-кривых. Для 16-19-дневных растений первоначальный наклон А-Сi-кривой, коррелирующий с активностью RuБисКО, равен 0,19 см/с, а для 22-28-дневных растений эта величина составляет 0,57 см/с. Таким образом, фермент RuБисКО более активен в молодых растениях, нежели в более зрелых. Этот результат подтверждает предположение о том, что скорость фотосинтеза уменьшается по мере созревания листьев.

Если сравнивать дикий тип и мутант с недостатком крахмала, то нужно отметить, что CO_2 компенсационная точка и начальный наклон А-Сi-кривых практически совпадают для дикого типа и для мутанта, т.е. редуцированный синтез крахмала не влияет на активность фермента RuБисКО и его специфичность к CO_2 . Однако при высоком уровне внутриклеточной концентрации CO_2 максимальная скорость поглощения CO_2 листьями мутанта примерно на 20% ниже, чем эта же величина для дикого типа. Подавление

фотосинтеза у мутантов по сравнению с диким типом при больших концентрациях CO_2 можно объяснить предположением о том, что ингибирование синтеза крахмала на уровне действия фермента АДФглюкозопирофосфорилазы приводит к недостатку неорганического фосфата в хлоропласте, что и вызывает подавление фотосинтеза у мутантов.

В пункте **III.3.3.** представлены результаты исследования влияния недостатка крахмала в листьях одиночных мутантов гороха и дикого типа на время полуспада кривых индукции замедленной люминесценции. Влияние уменьшенного содержания крахмала в листьях двойного мутанта с мутациями в генах, отвечающих за фермент, участвующий в разветвлении крахмала, и за АДФглюкозопирофосфорилазу, на период индукции замедленной люминесценции было исследовано ранее. Однако полученный результат увеличения периода полуспада кривых индукции у мутанта по сравнению с диким типом, обусловленный наличием двойной мутации, не позволяет понять, какой именно процесс ответственен за эффект. В данной работе на одиночных мутантах результаты измерения замедленной люминесценции показали, что время полуспада кривых индукции замедленной люминесценции больше для мутантов с мутацией в генах, отвечающих за активность фермента АДФглюкозопирофосфорилазы по сравнению с диким типом. Между мутантами с мутациями в генах, отвечающих за активность фермента, участвующего в разветвлении крахмала, и диким типом разница в пределах ошибки по ширине индукционных кривых не обнаружена. Таким образом, на время полуспада индукционных кривых замедленной люминесценции оказывают влияние лишь мутации в генах, отвечающих за активность фермента АДФглюкозопирофосфорилазы. Уменьшение активности этого фермента приводит к ингибированию реакции образования АДФ-глюкозы с выходом двух молекул фосфата, что вызывает недостаток неорганического фосфата внутри хлоропласта. Нехватка ортофосфата в строме приводит к подавлению фотосинтеза, т.е. к уменьшению скорости фиксации CO_2 и увеличению периода индукции. Мы предполагаем, что замедление синтеза крахмала из-за недостатка ортофосфата в строме приводит к увеличению периода индукции. В поддержку этого могут служить теоретические расчеты зависимости скорости выхода неорганического фосфата из цикла Кальвина на индукцию замедленной люминесценции. Результаты этих расчетов были описаны в разделе III.3.1.

Раздел III.3.4. посвящен изучению активации циклического транспорта в листьях мутантов гороха с недостатком крахмала. Мы исследовали влияние недостатка крахмала в листьях двойного мутанта гороха по сравнению с диким типом на активацию

циклического транспорта вокруг ФС1. Изучение проводилось с помощью определения стационарного значения величины поглощения фотоокисленных дальним красным светом центров P700⁺ и скорости восстановления P700⁺ в темноте после выключения дальнего красного света. Для исследования влияния недостатка крахмала в листьях гороха на активацию циклического транспорта мы использовали также метод термолюминесценции. Мы регистрировали свечение образца при нагреве с постоянной скоростью от 0°C до 100°C после облучения дальним красным светом в течение 10 секунд при 20°C. Из литературы известно, что появление при этом максимума "послесвечения" свидетельствует об активации циклического транспорта электронов вокруг ФС1.

Результаты экспериментов показали, что стационарные значения величины поглощения фотоокисленных центров P700⁺ при облучении образцов дальним красным светом ниже для мутантов, чем для дикого типа. Величина поглощения фотоокисленных центров P700⁺ в стационаре определяется соотношением скоростей окисления и восстановления реакционного центра ФС1. В данной работе адаптация растений к темноте в течение длительного периода времени исключает поток электронов на реакционные центры ФС1 от пула пластохинонов. Поскольку дальний красный свет возбуждает преимущественно ФС1, и пул пластохинонов не содержит электронов, то стационарное поглощение фотоокисленных центров P700⁺ определяется в основном соотношением скоростей окисления и восстановления реакционных центров ФС1 в процессе циклического электронного транспорта. Таким образом, мы предполагаем, что более низкие стационарные значения величины поглощения фотоокисленных центров P700⁺ у мутантов, чем у дикого типа, свидетельствует о том, что циклический транспорт электронов вокруг ФС1 активируется в листьях с недостатком крахмала. Кроме того, результаты измерений сигнала от P700⁺ при освещении образца дальним красным светом показали, что разница в стационарных значениях величины поглощения фотоокисленных центров P700⁺ между мутантом и диким типом тем больше, чем выше интенсивность дальнего красного света. Этот результат показывает, что активация циклического транспорта зависит от интенсивности дальнего красного света. С ростом интенсивности облучения возрастает поток электронов от восстановителей в строме на реакционный центр ФС1. Подтверждением полученных результатов, свидетельствующих об активации циклического транспорта в листьях мутантов гороха с недостатком крахмала, могут служить эксперименты по измерению скорости восстановления P700⁺ в темноте после выключения дальнего красного света. Следует отметить, что восстановление P700⁺ в темноте после выключения освещения имеет двухфазный характер и аппроксимируется суммой двух убывающих экспонент. В таблице 1 представлены скорости быстрой и

медленной фазы восстановления $P700^+$ в темноте после выключения дальнего красного света.

Таблица 1. Значения скорости быстрой (k_1) и медленной (k_2) фазы восстановления $P700^+$ в темноте после выключения дальнего красного света неотделенных листьев мутанта гороха (ttgbrb) и гороха дикого типа (RRRbRb) как функция интенсивности дальнего красного света. Символом σ обозначено стандартное отклонение от среднего значения.

Интенсивность дальнего красного света, у.е.	$k_1 \pm \sigma, c^{-1}$		$k_2 \pm \sigma, c^{-1}$	
	мутант ttgbrb	дикий тип RRRbRb	мутант ttgbrb	дикий тип RRRbRb
0	0	0	0	0
2	0,151±0,012	0,124±0,007	0,030±0,024	0,016±0,003
4	0,201±0,015	0,144±0,005	0,012±0,007	0,031±0,004
6	0,221±0,008	0,103±0,037	0,019±0,012	0,018±0,036
8	0,244±0,031	0,170±0,018	0,032±0,013	0,031±0,003
10	0,244±0,012	0,161±0,008	0,026±0,011	0,025±0,005

Из таблицы видно, что скорость быстрой фазы для мутантов примерно в 1,5–2 раза больше, чем для дикого типа, начиная со значения интенсивности облучения, соответствующего 4 относительным единицам. Величина скорости восстановления $P700^+$ в темноте после выключения дальнего красного света является мерой циклического потока электронов от восстановителей в строме на реакционный центр ФС1. Увеличение скорости быстрой фазы для мутантов по сравнению с диким типом указывает на более интенсивный поток электронов на реакционный центр ФС1 в случае мутантов. Поскольку растения и мутантов, и дикого типа находились в одинаковых условиях до измерений и в процессе эксперимента, то дополнительный поток электронов на реакционный центр ФС1 у мутантов можно объяснить активацией циклического транспорта. Разница в скоростях медленной фазы между диким типом и мутантами в пределах ошибки не обнаружена. Поскольку в данной работе доля медленной фазы составляет примерно 1/4 от быстрой фазы, то значениями скорости медленной фазы восстановления $P700^+$ в темноте после выключения дальнего красного света можно пренебречь.

Таким образом, результаты экспериментов по измерению стационарных значений величины поглощения фотоокисленных центров $P700^+$ при облучении образцов дальним красным светом и скорости восстановления $P700^+$ в темноте показывают, что в листьях мутантов гороха с недостатком крахмала в семенах активируется циклический транспорт электронов вокруг ФС1.

Раздел III.3.4.1. посвящен исследованию влияния увеличения температуры на активацию циклического транспорта электронов в листьях гороха.

Известно, что такие факторы как повышенная температура и увеличенная концентрация глюкозы и фруктозы в листьях способствуют активации циклического транспорта. В данной работе указанные воздействия использовались для установления их влияния на стационарные значения величины поглощения фотоокисленных центров $P700^+$, на скорости восстановления $P700^+$ после выключения дальнего красного света и на положение максимума термолюминесценции "послесвечения" или пика AG, отвечающего за циклический транспорт электронов.

Эксперименты по измерению сигнала от $P700^+$ при облучении образцов дальним красным светом показали, что стационарные значения величины поглощения фотоокисленных центров $P700^+$ при температуре листа $30^{\circ}\text{C} - 32^{\circ}\text{C}$ значительно ниже, чем при комнатной температуре. Причем сигнал от $P700^+$ при интенсивности дальнего красного света меньшей, чем 6 относительных единиц, не был обнаружен для мутантов и только при интенсивности в 5 относительных единиц был найден для дикого типа. Такое уменьшение стационарных значений величины поглощения фотоокисленных центров $P700^+$ свидетельствует о том, что в случае нагрева циклический поток электронов настолько велик, что он полностью восстанавливает (вплоть до интенсивности облучения, равной 6 относительным единицам, для мутантов) центры $P700^+$, окисленные дальним красным светом. Помимо этого, нужно отметить, что стационарные значения величины поглощения фотоокисленных центров $P700^+$ меньше в случае мутантов, чем в случае дикого типа. Полученный результат подтверждает заключение о том, что в листьях с недостатком крахмала активируется циклический транспорт, и показывает, что увеличение температуры до значения, когда повреждается ФС2, а ФС1 функционирует, делает циклический транспорт более интенсивным.

Данные, также свидетельствующие в пользу этого вывода, представлены в таблице 2, в которой приведены значения скорости быстрой (k_1) и медленной (k_2) фазы восстановления $P700^+$ в темноте после выключения дальнего красного света при температуре образца $30^{\circ}\text{C} - 32^{\circ}\text{C}$.

Таблица 2. Значения скорости быстрой (k_1) и медленной (k_2) фазы восстановления $P700^+$ в темноте после выключения дальнего красного света неотделенных листьев мутанта гороха (rrrbrb) и гороха дикого типа (RRRbRb) как функция интенсивности дальнего красного света при температуре листьев $30^{\circ}\text{C} - 32^{\circ}\text{C}$. Символом σ обозначено стандартное отклонение от среднего значения.

Интенсивность дальнего красного света, у.е.	$k1 \pm \sigma, c^{-1}$		$k2 \pm \sigma, c^{-1}$	
	мутант <i>ttgrb</i>	дикий тип <i>RRRbRb</i>	мутант <i>ttgrb</i>	дикий тип <i>RRRbRb</i>
5	–	0,389±0,098	–	0,112±0,051
6	1,433±0,344	0,455±0,076	0,226±0,028	0,152±0,021
8	0,829±0,072	0,512±0,073	0,240±0,045	0,155±0,059
10	0,862±0,043	0,763±0,051	0,210±0,021	0,182±0,016
11	0,939±0,038	0,827±0,085	0,133±0,016	0,177±0,009

Из таблицы 2 видно, что соотношение между величинами скорости для мутантов по сравнению с диким типом такое же, как при комнатной температуре, однако значения скоростей возросли в 2–4 раза. Этот результат подтверждает предположение о том, что в листьях мутантов с недостатком крахмала активируется циклический поток электронов вокруг ФС1. Причем с увеличением температуры этот поток усиливается больше, чем в листьях дикого типа.

Из литературы известно, что максимум термолюминесценции "послесвечение" или пик AG, появляющийся примерно при 40°C – 45°C, является индикатором циклического транспорта электронов вокруг ФС1. Для подтверждения результатов, полученных методом регистрации сигнала от P700⁺, в данной работе измерялась термолюминесценция листьев гороха дикого типа и мутантов с недостатком крахмала при нагреве от 0°C до 100°C с постоянной скоростью 0,333°C/с после облучения образцов дальним красным светом в течение 10 секунд. Результаты экспериментов показали, что максимум «послесвечения» для мутантов смещен в область более низких температур и имеет большую интенсивность по сравнению с диким типом. Это свидетельствует о том, что в листьях мутантов с недостатком крахмала активируется циклический поток электронов вокруг ФС1, и он более интенсивный, чем в листьях дикого типа.

Раздел III.3.4.2. посвящен исследованию влияния добавления сахаров на активацию циклического транспорта в листьях гороха.

Помимо температуры на активацию циклического транспорта может влиять избыточный уровень глюкозы и фруктозы в листьях. Есть данные, что увеличенная концентрация глюкозы и фруктозы способствует накоплению НАДФН в строме хлоропласта, что может способствовать появлению циклического потока электронов вокруг ФС1. В данной работе мы исследовали влияние добавления 100 мМ растворов глюкозы и фруктозы на циклический транспорт вокруг ФС1 в дисках, приготовленных из листьев мутантов *ttgrb* с недостатком крахмала и дикого типа *RRRbRb*. В качестве

контроля использовался 100 мМ раствор маннитола. Результаты измерений стационарных значений величины поглощения фотоокисленных дальним красным светом центров P700⁺ и значений скорости восстановления P700⁺ в темноте показали, что добавление 100 мМ глюкозы и фруктозы в пределах ошибки не повлияло на стационарные значения величины поглощения фотоокисленных центров P700⁺ и на значение скорости быстрой фазы восстановления P700⁺ в темноте в случае дикого типа. Однако в случае мутантов с недостатком крахмала в листьях небольшая разница по этим двум параметрам обнаружена. Разница в пределах ошибки для значений скорости медленной фазы между диким типом и мутантом не обнаружена, как в случае добавления маннитола, так и в случае инфильтрации сахаров, и поскольку доля медленной фазы составляет лишь 1/4 от быстрой фазы, то этим результатом можно пренебречь.

Эксперименты с инфильтрацией сахаров подтверждают заключение о том, что в листьях мутантов с недостатком крахмала активируется циклический электронный транспорт, и показывают, что добавление сахаров влияет на его активность, но в гораздо меньшей степени, чем нагрев. Кроме того, следует отметить, что добавление сахаров не вызывает активации циклического транспорта в листьях дикого типа в противоположность эффекту увеличения температуры. Таким образом, результаты экспериментов показали, что эффект добавления сахаров на активацию циклического транспорта вокруг ФС1 гораздо более слабый, чем действие нагрева.

Результаты измерений термолюминесценции листьев мутантов гороха с недостатком крахмала и листьев дикого типа с добавлением 100 мМ растворов глюкозы и фруктозы представлены на рисунках 4 и 5. В качестве контроля использовался 100 мМ раствор маннитола.

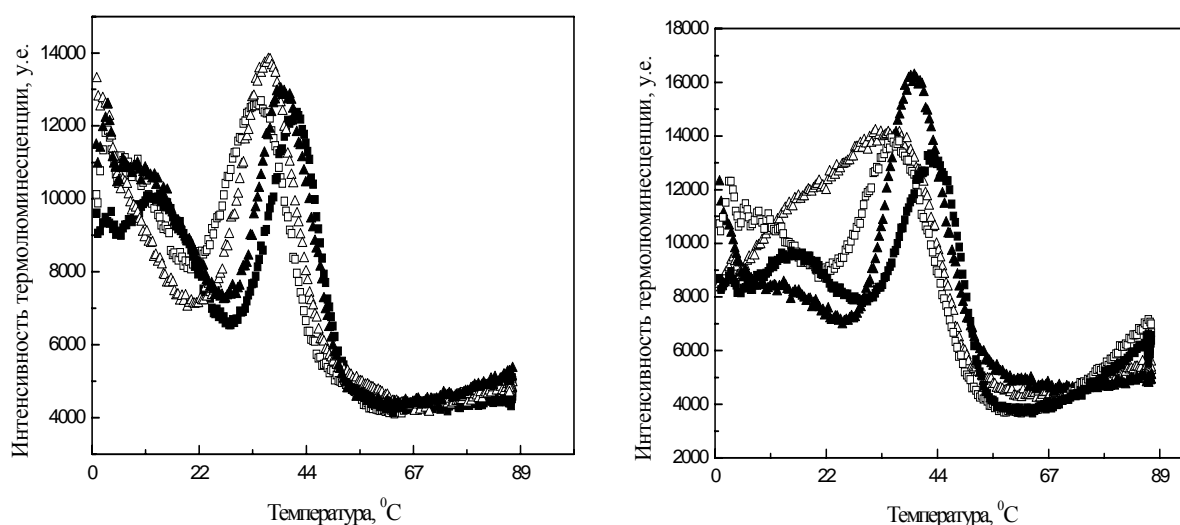


Рисунок 6. Типичные кривые термолюминесценции дисков листьев гороха (■) дикого типа, (▲) двойного мутанта с недостатком крахмала, (□) дикого типа с добавлением 100 мМ глюкозы, (Δ) двойного мутанта с добавлением 100 мМ глюкозы.

Рисунок 7. Типичные кривые термолюминесценции дисков листьев гороха (■) дикого типа, (▲) двойного мутанта с недостатком крахмала, (□) дикого типа с добавлением 100 мМ фруктозы, (Δ) двойного мутанта с добавлением 100 мМ фруктозы.

Из рисунков 6 и 7 видно, что максимумы «послесвечения» контролей мутантов с недостатком крахмала в листьях смещены в область более низких температур относительно контролей дикого типа. Этот результат свидетельствует о том, что в листьях с недостатком крахмала активируется циклический транспорт электронов. Кроме того, из рисунков видно, что максимум "послесвечения" или пик AG, появляющийся при 40°C – 45°C, для дисков с введенными в них растворами глюкозы и фруктозы смещен в область более низких температур относительно контролей. Этот результат обнаружен как для мутантов, так и для дикого типа. Следовательно, добавление сахаров влияет на активацию циклического транспорта как в случае мутантов с недостатком крахмала в листьях, так и в случае дикого типа, чего не было обнаружено методом регистрации сигнала от P700⁺. Объяснить это явление можно тем, что сигнал от P700⁺ измерялся при комнатной температуре, тогда как максимум термолюминесценции, отвечающий за циклический транспорт, появляется при нагреве до 40°C – 45°C. Возможно, что слабый эффект добавления сахаров на активацию циклического транспорта, обнаруженный в опытах по измерению сигнала от P700⁺, усиливается действием нагрева в случае регистрации термолюминесценции. Кроме того, поскольку образцы, использовавшиеся для измерений термолюминесценции, находились в растворах в течение длительного периода времени, пока проводилась опыты по измерению сигнала от P700⁺, то, возможно, что в течение этого времени произошла активация циклического транспорта, благодаря нахождению дисков в анаэробных условиях. Из литературы известно, что анаэробные условия также способствуют активации циклического транспорта.

Таким образом, результаты опытов с добавлением сахаров показывают, что добавление 100 мМ растворов глюкозы и фруктозы в диски мутантов с недостатком крахмала и в диски дикого типа способствует активации циклического транспорта, который усиливается под воздействием увеличения температуры и анаэробных условий.

Раздел III.3.4.3. посвящен изучению влияния добавления антимицина А и ротенона на циклический транспорт электронов в листьях гороха.

Для характеристики и обнаружения циклических путей применяют ингибиторы различных реакций, участвующих в переносе электронов вокруг ФС1. В данной работе для характеристики циклического транспорта использовались 20 мкМ раствор антимицина А, чувствительность к которому является индикатором цикла I, и 50 мкМ раствор ротенона, подавляющего цикл II. Влияние указанных веществ на циклический транспорт исследовалось методом регистрации термолюминесценции при нагреве образца от 0°C до 100°C с постоянной скоростью 0,333°C/с после облучения дальним красным светом в течение 10 секунд при комнатной температуре. Результаты экспериментов показали, что антимицин А подавляет пик АГ у мутантов, что свидетельствует о том, что в листьях мутантов активируется циклический поток электронов по типу I. Небольшое подавление пика АГ заметно также при обработке листьев мутантов раствором ротенона. Вероятно, полученные результаты свидетельствуют о том, что в листьях мутантов возможна активация различных циклических путей, однако более мощным является цикл I. Максимум послесвечения для дикого типа оказался нечувствительным ни к обработке антимицином А, ни к обработке ротеноном.

Раздел III.4. посвящен исследованию влияния оттока сахарозы из листьев высших растений на параметры кривых индукции замедленной люминесценции. Транспорт сахарозы ограничивался с помощью охлаждения черешков листьев примерно до 0°C, а также введением в черешки ингибиторов транспорта сахарозы: флоридзина и ПХМБ в различных концентрациях. Типичные кривые индукции замедленной люминесценции неотделенного листа китайской розы (*Hibiscus rosa chinensis*) до (1) и после 2 часов охлаждения черешка листа на свету до 0°C (2) представлены на рисунке 8.

Результаты экспериментов показали, что после охлаждения черешков листьев в течение 2 часов на свету время полуспада кривых индукции замедленной люминесценции уменьшилось. Полученный результат можно объяснить тем, что накопление сахарозы в проводящих тканях растения приводит к уменьшению скорости ее синтеза в цитоплазме фотосинтезирующих клеток. В результате этого уменьшается выход ТФ в цитозоль. Следовательно, ТФ в основном поступают в цикл Кальвина на регенерацию РубФ, и меньшая их часть экспортируется в цитозоль для образования сахарозы.

Благодаря увеличению концентрации РубФ, являющегося субстратом в реакции фиксации углерода, возрастает скорость ассимиляции CO_2 , что отражается на кривых индукции уменьшением их ширины.

Результаты экспериментов по исследованию влияния добавления ингибиторов транспорта сахарозы на параметры индукционных кривых замедленной люминесценции показали, что после их введения время полуспада кривых индукции замедленной люминесценции увеличилось на 40% – 50% по сравнению с контролем. Объяснить полученный результат можно тем, что накопление сахарозы в проводящих тканях, из-за ограничения ее оттока с помощью ингибиторов, по типу отрицательной обратной связи уменьшает скорость фотосинтеза, чтобы в цикле Кальвина производилось меньше триозофосфатов, которые участвуют в синтезе сахарозы. Уменьшение скорости

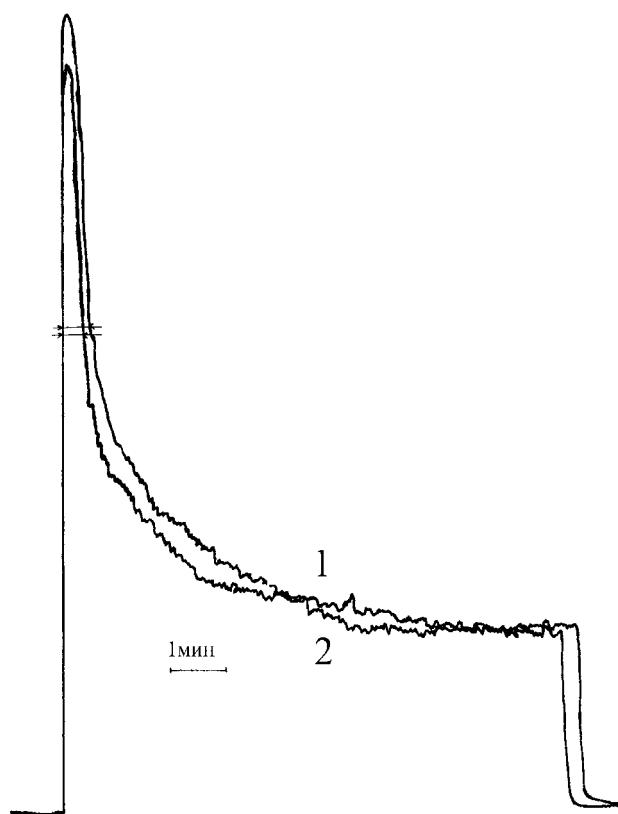


Рисунок 8. Кривые индукции замедленной люминесценции неотделенного листа китайской розы (*Hibiscus rosa chinensis*) (1) без охлаждения черешка листа (20°C) и (2) после 2 часов охлаждения черешка листа на свету (0°C).

фотосинтеза отражается на кривых индукции увеличением времени полуспада интенсивности замедленной люминесценции.

Помимо описанного увеличения времени полуспада индукционных кривых, результаты экспериментов по измерению замедленной люминесценции показали, что отношение максимума к стационару после добавления флоридзина и ПХМБ уменьшается. Это происходит благодаря росту стационарного уровня интенсивности замедленной люминесценции. Увеличение стационара свидетельствует об уменьшении скорости стационарного фотосинтеза.

Таким образом, и рост ширины индукционных кривых, и увеличение стационарного уровня замедленной люминесценции позволяют сделать вывод, что добавление ингибиторов переносчика сахарозы, флоридзина и ПХМБ, приводит к уменьшению скорости фотосинтеза. Однако при ограничении оттока сахарозы при помощи охлаждения черешков листьев был получен противоположный результат сужения индукционных кривых, т.е. роста скорости фотосинтеза.

Возможно, что в случае охлаждения замедление транспорта сахарозы происходит в меньшей степени, чем при добавлении ингибиторов, чего не достаточно для накопления такого количества сахарозы, чтобы уменьшить скорость фотосинтеза по типу отрицательной обратной связи. Поскольку в случае охлаждения не происходит блокирования белка-переносчика, то, возможно, что в случае охлаждения скорость цикла Кальвина возрастает, чтобы производить больше триоз для синтеза сахарозы, с помощью роста концентрации которой было бы возможно восстановить транспортную активность белка-переносчика.

При добавлении ингибиторов происходит, фактически, инактивация переносчика, и увеличение концентрации сахарозы в результате работы цикла Кальвина приводит только к ее накоплению, а не к возврату транспортной активности переносчика, как это, возможно, происходит в случае охлаждения.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

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 время полуспада индукционных кривых. Полученный результат показывает взаимосвязь первичных процессов фотосинтеза с транспортом и запасанием продуктов фиксации CO_2 и важную роль неорганического фосфата для регуляции метаболизма углерода.
2. Спектрофотометрическим методом обнаружено, что листья мутантов гороха с недостатком крахмала в семенах содержат примерно на 30% – 50% меньше крахмала, чем дикий тип. Это приводит к уменьшению эффективности фотосинтеза при больших концентрациях CO_2 и к увеличению времени полуспада кривых индукции замедленной люминесценции в случае мутации, влияющей на активность фермента АДФглюкозопирофосфорилазы. Полученный результат свидетельствует о том, что уменьшенное содержание крахмала вызывает подавление фотосинтеза из-за недостатка неорганического фосфата в хлоропласте.
3. Исследование термолюминесценции и окислительно-восстановительного состояния P700 показало, что недостаток крахмала в листьях гороха приводит к активации циклического транспорта вокруг ФС1, на который влияет добавление сахаров и увеличение температуры.
4. Ограничение оттока сахарозы из листьев китайской розы и узумбарской фиалки при охлаждении или введении ингибиторов транспорта сахарозы в проводящие ткани влияет на время полуспада индукционных кривых замедленной люминесценции. При этом эффект охлаждения противоположен действию ингибиторов. Это свидетельствует о различии в этих двух случаях в подавлении переносчика сахарозы. Этот процесс вызывает реакции, приводящие в результате к увеличению скорости фотосинтеза в случае охлаждения и к уменьшению при добавлении ингибиторов транспорта сахарозы.

Основное содержание работы отражено в следующих публикациях:

1. А.А. Тулешова, С.А. Кузнецова. Теоретическое исследование влияния фосфатного метаболизма на индукционные явления фотосинтеза. Сборник тезисов международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам “Ломоносов-99”, секция “Физика”. Физический факультет МГУ, 1999. С. 8-10.
2. А.А. Тулешова. Исследование влияния синтеза крахмала на индукцию фотосинтеза с помощью теоретической модели. Сборник тезисов VII международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам “Ломоносов-2000”, секция “Физика”. Физический факультет МГУ, 2000. С. 64.
3. А.А. Тулешова. Теоретическое исследование влияния скорости синтеза крахмала на индукционные явления фотосинтеза. Сборник тезисов стендовых сообщений школы-конференции “Горизонты физико-химической биологии”. Пущино, 2000. С. 323-324.
4. С.А. Кузнецова, А.А. Тулешова. Кинетика флуоресценции хлорофилла и регуляция фотосинтеза высших растений. Материалы 2-й международной конференции “Фундаментальные проблемы физики”. Саратов, 2000. С. 113.
5. А.А. Тулешова, С.А. Кузнецова. Влияние оттока сахарозы на индукционные явления фотосинтеза. Сборник тезисов международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам “Ломоносов-2001”, секция “Физика”. Физический факультет МГУ, 2001. С. 37-39.
6. A. Tuleshova, D. Badretdinov, A. Kukushkin, S. Khuznetsova. The influence of sugar synthesis and transport rates on bioenergetics and kinetics of higher plant photosynthesis. Book of abstracts the XVI-th International symposium on bioelectrochemistry and bioenergetics. Comenius University, Bratislava, Slovakia 1-6 June 2001. P. 55.
7. S. Khuznetsova, T. Bogracheva, C. Hedley, A. Tuleshova, A. Kukushkin. The rate of transport through a phosphate translocator affects delayed luminescence induction: an experiment and a theoretical model. Annals of applied Biology, 2001. V.138. P.117-121.
8. A. Tuleshova, D. Badretdinov, A. Kukushkin, S. Khuznetsova. The influence of sugar synthesis and transport rates on bioenergetics and kinetics of higher plant photosynthesis. Bioelectrochemistry, 2002. V.56/1-2 P. 203-205.
9. А.А. Тулешова, С.А. Кузнецова, А.К. Кукушкин. Влияние оттока сахарозы из листьев высших растений на индукцию замедленной люминесценции при фотосинтезе. Биофизика, 2002. Т. 47, вып. 4. С. 691-695.
10. Д.З. Бадретдинов, Е.А. Баранова, С.А. Кузнецова, А.А. Тулешова, А.К. Кукушкин. Экспериментальное и теоретическое исследование температурной зависимости

стационарного значения индукции замедленной люминесценции листьев высших растений. Биофизика, 2002. Т. 47, вып. 5. С. 872-877.

11. А.А.Тулешова, С.А. Кузнецова, Д.З.Бадретдинов. Влияние накопления крахмала в листьях высших растений на индукцию фотосинтеза. Сборник тезисов международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам “Ломоносов-2002”, секция “Физика”. Физический факультет МГУ, 2002. С. 9-11.
12. А.А.Тулешова, С.А. Кузнецова, А. К. Кукушкин. Влияние концентрации внешнего фосфата и охлаждения на замедленную люминесценцию листьев высших растений. Сборник расширенных тезисов докладов научной конференции «Ломоносовские чтения», секция «Физика». Физический факультет МГУ, 2002. С. 56-59.