

ЗАПАСАНИЕ И ДИССИПАЦИЯ ЭНЕРГИИ СВЕТА РАСТЕНИЯМИ КАК ВЗАИМНО ДОПОЛНЯЮЩИЕ ПРОЦЕССЫ, ВОВЛЕЧЕННЫЕ В ПОДДЕРЖАНИЕ ЖИЗНИ РАСТЕНИЯ

Ульрих Хебер, Отто Людвиг Ланге¹ и Владимир А. Шувалов²

¹Институт биологических наук им. Юлиуса фон Сакса, Вюрцбургский Университет, D-97082 Вюрцбург, Германия;

²Институт Фундаментальных проблем биологии, Российская Академия Наук, Пуццино-на-Оке, Московская область, и лаборатория биофизики, Институт Химико-физической биологии, Московский Государственный Университет, Москва 119992, Россия

Резюме

Взаимосвязь между фотосинтетическим запасанием и тепловой диссипацией энергии света рассмотрена на примере фотосинтезирующих организмов, способных выносить полное обезвоживание на сильном свете без существенных фотоокислительных нарушений. Когда вода становится доступной высохшим пойкилогидрическим организмам, они возобновляют фотосинтетическое окисление воды. Избыток света рассеивается в тепло по механизму, зависящему от протонирования тилакоидных белков и присутствия зеаксантина. В устойчивых к высыханию мхах и лишайниках при высыхании активируется другой механизм, который не требует ни протонирования, ни присутствия зеаксантина, хотя зеаксантин-зависимый механизм диссипации энергии остается активным, если высушивание происходит на свету. В гидратированных мхах индуцированный высыханием механизм может исчезать или ослабляться во время продолжительного выдерживания в темноте, но активироваться, когда высыхание происходит на свету. Тепловая диссипация энергии выражается в тушении максимальной или/и фоновой флуоресценции хлорофилла. В растениях, у которых тушение фоновой флуоресценции либо не наблюдается, либо слабо выражено, циклический транспорт электронов в реакционном центре фотосистемы и наносекундное разделение зарядов между окисленным P680 и восстановленным хлорофиллом, так же как донирование электронов от каротиноидов на P680⁺, понижает уровни сильного окислителя P680⁺ и таким образом вносит вклад в фотозащиту.

Введение

Автотрофная жизнь растений основана на способности фотосинтетических пигментов поглощать свет и использовать его энергию для эндэргонических реакций, таких как окисление воды. Электроны, освобождающиеся во время выделения кислорода, переносятся на такие акцепторы электронов, как CO_2 . Поэтому окисленный углерод CO_2 восстанавливается до сахара. Сахара служат основным топливом для экзэргонических реакций, поддерживающих жизнь не только растений, но также и гетеротрофных форм жизни, включая человека.

Основным требованием для поддержания автотрофной жизни растений является доступность света, воды и CO_2 для фотосинтеза. Однако в то время как поглощение света фотосинтетическими пигментами пропорционально интенсивности света, для фотосинтеза такая зависимость не выполняется. Практически весь поглощенный свет используется для фотосинтетических реакций только в случае очень низких интенсивностей света. В противоположность этому растения неизменно получают избыточное количество света, когда находятся на ярком солнечном свете. В этом случае поглощение CO_2 становится лимитирующей скоростью фотосинтеза стадией. В этом случае поглощенный фотосинтетическим аппаратом свет может активировать атмосферный кислород, который в виде синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$) является либо неспецифическим окислителем, либо в виде однократно восстановленной формы (O_2^-) приводит к образованию активных кислородных радикалов (Siefertmann-Harms, 1987; Owens, 1996; Asada, 1999). Вопрос о природе механизмов, предотвращающих разрушение фотосинтетического аппарата гидратированных растений избыточной энергией возбуждения за счет неспецифического окисления, был и остается предметом интенсивных исследований (Demmig-Adams, 1990; Björkman и Demmig-Adams, 1995; Gilmore и Govindjee, 1999; Niyogi, 1999; Li и др., 2002; Aspinall-O'Dea и др., 2002; Ruban и др., 2002; Ma и др., 2003; Wentworth и др., 2003; Krause и Jahns, 2003 и другие).

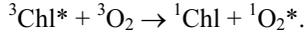
В то время как выживание большинства высших растений зависит от поддержания гидратированности, некоторое количество специализированных видов, *Selaginella lepidophylla*, переносят полное высушивание (Gaff, 1997). То же самое относится к большому количеству криптогамных организмов (Green и Lange, 1995; Alpert, 2000). Многие мхи, лишайники и аэрофильные водоросли выдерживают обезвоживание в течение длительных периодов времени. Они не имеют корней. Для их метаболической активности достаточно влаги, которую они получают из окружающей среды. В природе время гидратирования для этих организмов часто бывает ограничено. В умеренных условиях эпилитные или наземные лишайники гидратированы в течение 35–65 % года, в зависимости от вида лишайника и

условия обитания. У пустынных лишайников всего лишь 10 % или даже меньше времени их жизни водный потенциал достигает достаточного уровня для осуществления активного фотосинтеза и/или дыхания (Evans и Lange, 2003). Остальную часть жизни они проводят в высушенном состоянии. При дневном освещении они подвержены высоким уровням освещенности. В таких условиях выживание зависит от механизмов, обеспечивающих диссипацию поглощенного излучения. Способность пойкилогидрических автотрофов справляться с сильной освещенностью видоспецифична. Многие лишайники не столь сильно повреждаются интенсивным освещением в обезвоженном состоянии по сравнению с гидрированным состоянием (Demmig-Adams и др., 1990). Устойчивость к дозе облучения имеет сильную адаптивную компоненту и зависит от условий обитания и предыдущих воздействий (Gauslaa и Solhaug, 2004). Лишайники из затененных местообитаний повреждаются на сильном свете даже в обезвоженном состоянии (Gauslaa и Solhaug, 1999; Gauslaa и др., 2001).

При фотосинтезе лишь несколько специализированных молекул хлорофилла участвуют в транспорте электронов от воды к физиологическим акцепторам. Во много раз большее количество молекул хлорофилла, наряду с некоторыми каротиноидами, собирают солнечную энергию. Поглощенная энергия возбужденного состояния мигрирует и улавливается ограниченным числом хлорофилл-содержащих реакционных центров (РЦ). Реакционные центры фотосистемы II (ФСII), где происходит окисление воды, состоят из двух белков, D1 и D2, и содержат 6 хлорофиллов, два феофетина, два β -каротина, два хинона и один или два гема цитохрома b559 (рис. 1). Эндэргоническое окисление димера хлорофилла, называемого P680, приводит к появлению окислителя с редокс-потенциалом, достаточным для окисления воды в несколько стадий. Высвободившиеся электроны переносятся сначала на один из связанных хинонов РЦ, пластохинон (PQ), который называется Q_A, затем на Q_B и оттуда, через несколько последующих стадий, включая также реакционный центр фотосистемы I (FSI), – на физиологический акцептор электронов CO₂.

Когда вода доступна в качестве донора электронов, ее окисление восстанавливает окисленный первичный донор электронов, P680⁺, который образуется в результате разделения зарядов в РЦ ФСII. Это предотвращает неспецифические окислительные побочные реакции с участием P680⁺, которые могут разрушить компоненты фотосинтетического аппарата. Если поглощенная энергия не переносится на РЦ, необходимы альтернативные пути переноса энергии для предотвращения повреждения фотосинтетического аппарата. При отсутствии эффективной тепловой диссипации возбуждение светособирающих молекул хлорофилла приводит к усиленному образованию долгоживущих триплетных состояний пигментной матрицы. Если детоксикация триплетов каротиноидами (Siefermann-

Harms, 1987) не справляется с накоплением триплетных состояний, возникает сильнейший окислитель – синглетный кислород:



Неспецифическое окисление при участии ${}^1\text{O}_2^*$ может приводить в конце концов к гибели клетки.

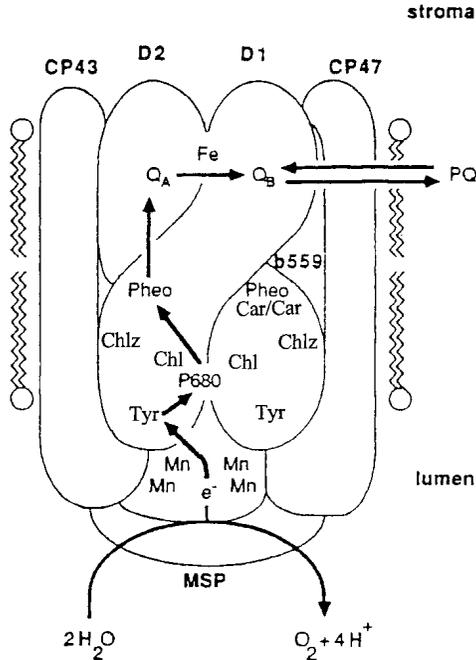


Рис. 1. Схема строения комплекса ФСII с хлорофилл-связывающими белками CP43 и CP47, D1 и D2 белками РЦ, магний-содержащим белком комплекса окисления воды и белком MSP (Vermaas, 1993; расположение белков по Kamiya и Shen, 2003). Согласно общепринятой точке зрения феофитин (Pheo) является первичным акцептором электронов, но недавние данные свидетельствуют о том, что эту роль выполняет хлорофилл, следующий за P680 (Shuvalov и Heber, 2003)

Очевидно, что проблема избыточного возбуждения становится еще более острой, когда фотосинтезирующие организмы теряют воду. В этой статье мы только кратко коснемся запасаения солнечной энергии в фотосинтезе, но уделим непосредственное внимание проблемам контролируемой диссипации энергии в тепло и обезвоживанию фотосинтезирующих организмов как основному способу фотозащиты растений.

Флуоресценция хлорофилла как инструмент для расчета фотосинтетического транспорта электронов и оценки эффективности тепловой диссипации энергии как пути сброса избытка энергии возбуждения

Энергия света, поглощенного фотосинтетическим аппаратом, может либо использоваться для фотохимического разделения зарядов в РЦ, либо может быть высвечена в виде флуоресценции, или может быть безопасно рассеяна в виде тепла. При низких освещенностях практически все кванты света используются для фотохимического разделения зарядов. Излучение флуоресценции практически отсутствует. Потери на тепловую диссипацию энергии отсутствуют, пока не активированы соответствующие механизмы диссипации. Хотя максимальный уровень флуоресценции хлорофилла составляет немногим больше 3 % от поглощенного света, интенсивность флуоресценции может дать важную информацию не только о фотосинтетическом транспорте электронов, но также и о диссипации энергии в фотосинтетическом аппарате (Bradbury и Baker, 1981; Schreiber и др., 1986; Krause и Weis, 1991). Необходимое оборудование, которое сегодня производится несколькими фирмами, дает возможность использовать модулированную флуоресценцию, нечувствительную к намного более интенсивной флуоресценции, вызванной действующим светом, для исследования не только редокс-состояния фотосинтетического аппарата, но и рассеивания избыточной энергии, не использованной в фотосинтезе (Schreiber и др., 1988; Schreiber и Bilger, 1993; Krause и Jahns, 2003).

При очень низкой интенсивности освещения практически все РЦ, способные к преобразованию световой энергии в энергию разделенных зарядов, открыты. Модулированная флуоресценция, излучаемая ФСЦ, тогда достигает минимального значения, поскольку скорость использования энергии в фотохимических реакциях выше, чем скорость флуоресценции и тепловой диссипации. Использование энергии для разделения зарядов достигает максимального значения. Перед освещением такие важные переносчики электронов для фотосинтетического транспорта электронов как Q_A в РЦ ФСЦ, не окислены. Короткая сильная вспышка, длящаяся приблизительно 1 с, временно закрывает все реакционные центры ФСЦ, приводит к максимальной модулированной флуоресценции, потому что акцепторы электронов теперь восстановлены и больше не способны принимать электроны. Фотохимическое разделение между P^* и Q_A более невозможно. Тепловая диссипация энергии еще не активирована. Выход флуоресценции увеличивается. Разница между максимальной (F_m) и минимальной или фоновой (F_o) флуоресценцией, деленная на максимальную флуоресценцию, т.е. $(F_m - F_o)/F_m = \Delta F/F_m$, является показателем максимальной квантовой эффективности разделения зарядов в ФСЦ (Genty и др., 1989), поскольку при комнатных температурах флуоресценция ФСЦ

незначительна. У большого числа темноадаптированных высших растений, не подверженных стрессу, $\Delta F/F_m$ составляет приблизительно 0.8 (Björkman и Demmig, 1987), что свидетельствует об общей тенденции многих растений использовать световую энергию исключительно на фотосинтез при низких интенсивностях света.

Поскольку при высоких интенсивностях света часть РЦ ФСII закрыта, значения $\Delta F/F_m$ опускаются ниже 0.8 во время стационарного фотосинтеза, отражая низкую квантовую эффективность разделения зарядов в ФСII в условиях фотосинтетических потоков. Для определения скорости потока электронов через ФСII по данным измерения флуоресценции необходимо умножить квантовую эффективность разделения зарядов на количество квантов, поглощенных ФСII. Однако при этом необходимо сделать поправку на поглощение света не только ФСII, но и ФСI. Для расчета ассимиляции углерода часто предполагают, что половина квантов, поглощенных в листе, используется в ФСII, а другая половина – в ФСI. Это не всегда приводит к хорошему соответствию между рассчитанными и измеренными скоростями фотосинтеза (Lange и др., 2001; Lange, 2003a). Если существует основание предполагать существенное расхождение, прямое измерение восстановления CO_2 может быть использовано для калибровки данных флуоресценции, но необходимо экспериментально исключить поток электронов при фотодоухании и альтернативные пути транспорта электронов (Heber et al., 1995).

Когда энергия света не может быть использована на разделение зарядов в РЦ (т.е. когда все РЦ закрыты), а диссипирует по альтернативным путям, модулированная флуоресценция опускается ниже своего максимального уровня. F_m понижается до F_m' . Кажется, что это является простым следствием конкуренции между флуоресценцией и тепловой диссипацией энергии, когда фотохимическая конверсия больше не возможна (Kitajima и Butler, 1975). Однако, поскольку выход флуоресценции никогда не превышает 2–3% даже при высоких интенсивностях освещения, было высказано предположение и было экспериментально показано, что в РЦ происходит другой тип фотохимических превращений, конкурирующий с тепловой диссипацией энергии. Тем не менее понижение уровня флуоресценции все же является достоверным показателем увеличения уровня тепловой диссипации энергии. Если $F_0 = k_f/(k_f+k_p+k_d)$ и $F_m = k_f/(k_f+k_d)$ (где k_f , k_p и k_d – константы скоростей флуоресценции, фотохимических реакций и тепловой диссипации энергии), квантовый выход фотохимических процессов, $\Phi = k_p/(k_f+k_p+k_d)$, пропорционален $(F_m-F_0)/F_m$. Если существует дополнительный уровень между P^* и $P^+Q_A^-$ (P^+I^-), не сильно отличающийся по свободной энергии от P^* (небольшое ΔE), то k_f становится меньше в $\exp(-\Delta E/kT)$ раз, поскольку концентрация P^* меньше, чем концентрация P^+I^- на такую же величину. Другие константы такие же,

но они теперь связаны с P^+T . Если $\Delta E = 0.1$ эВ, то при комнатной температуре ($kT = 0.025$ эВ) квантовый выход флуоресценции не может намного превышать 2% даже в случае «акрытых» РЦ. В конечном счете можно получить количественное выражение для нефотохимического тушения флуоресценции, которое рассчитывается по формуле $NPQ = (Fm/Fm' - 1)$.

Регуляция диссипации энергии может быть отслежена по обратимости изменений флуоресценции, не связанной с редокс-изменениями в фотосинтетическом аппарате. Эти простые зависимости составляют основу большинства работ по анализу состояния фотосинтетического аппарата при разных условиях окружающей среды, включая изменения в интенсивности освещенности, температуре, доступности CO_2 и воды и др.

Использование света в фотосинтезе

На рис. 2 показана зависимость между поглощением света фотосинтетическими пигментами от фотосинтетического окисления воды для различных групп растений. При лимитирующих интенсивностях света практически все поглощенные кванты света используются на фотосинтез. В результате начальный наклон кривой зависимости скорости фотосинтеза от плотности потока фотонов (т.е. интенсивности света) практически идентичен у многих различных растений. При увеличении интенсивности света диффузия CO_2 из воздуха через устьичный барьер в листьях к фотосинтетическому аппарату начинает лимитировать окисление воды. При этом фотосинтез лимитируется как светом, так и CO_2 . На солнечном свету CO_2 является основным лимитирующим фотосинтез фактором во многих случаях, даже когда устьица широко открыты. Свет в этом случае присутствует в избытке. Если, например, максимальная общая ассимиляция углерода у сельскохозяйственных C_3 растений составляет $30 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ при плотности потока фотонов $1800 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ на солнечном свету, то на ассимиляцию углерода используется приблизительно только 30 % поглощенной световой энергии. Остальные 70 % должны быть рассеяны в виде тепла. В этом расчете учитывается не только степень поглощения света в листьях, но и энергетические потребности фотодыхания, которое сопровождает ассимиляцию углерода в C_3 растениях. Очевидно, что более низкая ассимиляция углерода на солнечном свету, по сравнению с рассчитанной для этого примера, увеличивает долю энергии поглощенного света, которая должна быть рассеяна в виде тепла.

Во многих случаях и у многих фотосинтезирующих организмов CO_2 не является единственным лимитирующим фотосинтез фактором на сильном свету. Генетические и адаптивные факторы, питание растения и различные стрессовые факторы, особенно водный стресс, все они сдвигают зависимость между окислением воды и фотосинтезом, показанную на

рис. 2, к более низким уровням насыщения (Green и Lange, 1995). Вследствие этого большее количество света является избыточным. У дегидрированных пойкилогидрических автортофов, обладающих очень низким квантовым выходом флуоресценции, почти вся поглощенная энергия света должна быть преобразована в тепло, чтобы предотвратить вызванное светом окислительное повреждение. Это требует эффективных механизмов тепловой диссипации энергии. Тонкая регуляция этих механизмов обеспечивает доминирование фотосинтетического преобразования энергии над тепловой диссипацией энергии при низком потоке фотонов и доступности воды.

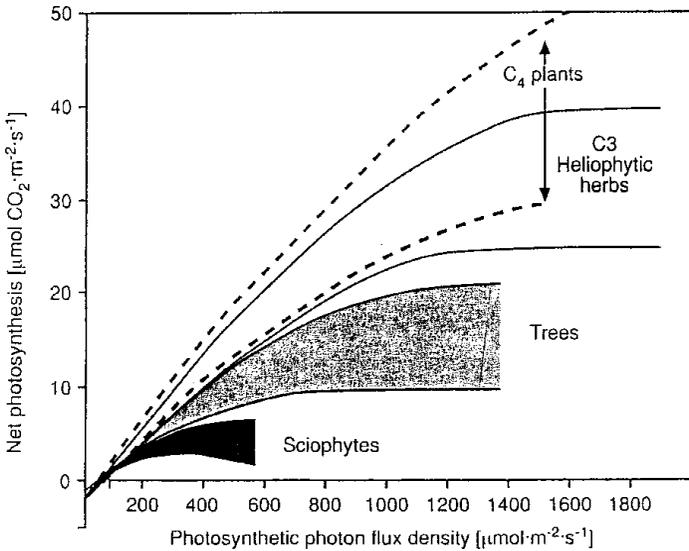


Рис. 2. Зависимость суммарного фотосинтеза от фотосинтетической плотности потока фотонов при оптимальных температурах и окружающих концентрациях CO₂ для растений из разных функциональных групп: C₄ растения и большая группа C₃ растений, включающая светолюбивые растения, деревья и тенелюбивые растения (Larcher, 2003)

Биохимический механизм фотосинтеза сложен. Когда две молекулы воды окисляются внутри замкнутой тилакоидной мембранной системы хлоропластов, одна молекула кислорода выделяется из хлоропластов, а четыре протона остаются внутри тилакоидов (рис. 3). Когда четыре освободившихся электрона движутся по энергетическому градиенту в электрон-транспортной цепи в мембране, дополнительные восемь протонов закачиваются внутрь тилакоида. Этот перенос протонов происходит во время реакций цитохромного b/f-комплекса Риска центра и дополнитель-

ный перенос протонов, в так называемом Q-цикле. Однако восстановление одной молекулы CO_2 в цикле Кальвина требует не только четыре электрона, но еще и три молекулы АТФ. Эндэргонический синтез АТФ происходит за счет энергии транстилакоидного протонного градиента, который представлен разностью концентраций протонов внутри и снаружи тилакоидной мембраны фотосинтетического аппарата. Поскольку стехиометрическое отношение $\text{H}^+/\text{АТФ}$ равно четырем (Rumberg и др., 1990; Kobayashi и др., 1995; Naraux и de Kouchkovsky, 1998) или немного больше (Joliot и Joliot, 2002), не более трех молекул АТФ может быть синтезировано во время выхода из тилакоидов 12 протонов. Поэтому вход и выход протонов из тилакоидов во время ассимиляции углерода в основном сбалансированы. Вследствие этого относительно небольшой градиент протонов может обеспечить потребности в АТФ для ассимиляции углерода. Очень сходные отношения выполняются для потребностей в АТФ в фотодыхании. Это имеет важные следствия для соотношения между фотосинтетическим преобразованием энергии и тепловой диссипацией энергии.

Роль зеаксантина в тепловой диссипации энергии у оводненных растений

Хотя уже давно известно, что концентрация ксантофилла зеаксантина в фотосинтетических мембранах высших растений обратимо увеличивается на свету за счет снижения уровня виолонксантина (Yamamoto и др., 1962; Sapozhnikov и др., 1966; Hager, 1969), роль зеаксантина в тепловой диссипации была отмечена Барбарой Деммиг из Вюрцбургского Университета только в 1987 (Demmig-Adams, 1990). К настоящему времени накоплено внушительное количество данных о не только широком распространении зеаксантин-зависимой тепловой диссипации энергии в зеленых растениях, но и о механизмах этого процесса (Gilmore и Govindjee, 1999; Niyogi, 1999; Heber и др., 2000; Li и др., 2002; Aspinall-O'Dea и др., 2002; Ruban и др., 2002; Ma и др., 2003; Wentworth и др., 2003 и другие). Обобщая полученные результаты, следует отметить, что специализированный белок в антенне ФСII, продукт гена PsbS, изменяет свою конформацию при протонировании. Протонированный белок способен образовывать комплекс с зеаксантином, который выступает в качестве эффективного тушителя энергии возбуждения. Этот комплекс конкурирует с открытыми реакционными центрами за захват энергии возбуждения. Тонкая регуляция обеспечивает приоритет ассимиляции над тепловой диссипацией энергии. В то время как линейный светозависимый транспорт электронов от воды на CO_2 , как показано на рис. 3, сопровождается сбалансированным переносом протонов внутрь замкнутой фотосинтетической мембранной системы и выбросом протонов, необходимым для поддержания необ-

ходимого для ассимиляции CO_2 синтеза АТФ, дополнительное подкисление тилакоидов необходимо для протонирования PsbS-белка. Это становится возможным благодаря альтернативным путям светозависимого транспорта электронов, сопряженного с переносом протонов. В реакции Меллера вода окисляется и кислород выделяется так же, как при ассимиляции углерода, но выделившиеся электроны служат для восстановления кислорода, а не CO_2 (Mehler, 1951). Поскольку суммарный газообмен отсутствует, реакцию также называют псевдоциклическим транспортом электронов, чтобы отличить ее от циклического транспорта электронов вокруг ФСІ (Arnon, 1977). Как при псевдоциклическом, так и при циклическом транспорте электронов дополнительные протоны закачиваются внутрь тилакоида. Разновидность реакции Меллера включает окисление аскорбата и восстановление аскорбат-радикала и известна как водно-водный цикл (Asada, 1999).

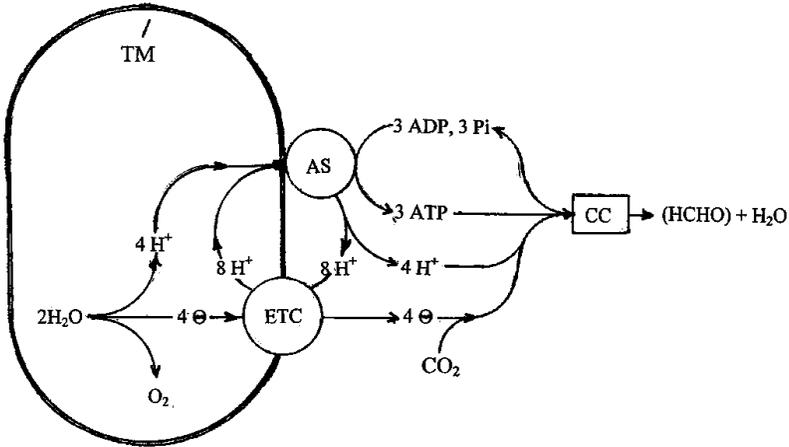


Рис. 3. Накопление протонов во время окисления воды внутри замкнутых тилакоидных мембран (ТМ), транспорт протонов внутрь тилакоидов во время линейного транспорта электронов и выход протонов во время синтеза АТФ, необходимый для восстановления CO_2 до (НСНО). ЕТС, электрон-транспортная цепь; АS, АТФ синтаза; СС, цикл углерода; остальные разъяснения приведены в тексте

Эти реакции вступают в действие, когда недостаток CO_2 начинает ограничивать скорость восстановления углерода (Heber, 2003). Например, большое расхождение в скорости линейного транспорта электронов, рассчитанного по флуоресценции и измеренного по ассимиляции углерода, возникает у лишайников, когда насыщение растения водой ограничивает скорость диффузии CO_2 к фотосинтетическому аппарату (Lange, 2003a).

Альтернативный транспорт электронов усиливает подкисление внутренней среды тилакоидов. Содержание протонов становится достаточным для протонирования PsbS-белка. Также известно, что низкий уровень pH внутри тилакоида приводит к деэпоксидации ксантофилла виолоксантина до зеаксантина (Hager, 1969, Pfündel и Dilley, 1993). Зеаксантин накапливается за счет уменьшения концентрации виолоксантина. Наличие зеаксантина и протонирование PsbS-белка создает условия для образования центров диссипации энергии, которые отводят энергию возбуждения от РЦ ФСII. Таким образом, когда свет присутствует в избытке и ассимиляция ограничивается доступностью CO₂, понижение внутритилакоидного pH предотвращает чрезмерное возбуждение РЦ ФСII.

Тем не менее несколько вопросов все еще остаются открытыми. Суть всегда заключена в деталях. У высших растений была отмечена сильная корреляция между уровнями зеаксантина и нефотохимического тушения флуоресценции NPQ (т.е. тепловой диссипации энергии) (Björkman и Demmig-Adams, 1995). Максимальные отношения зеаксантина к хлорофиллу достигали 0.1 на солнечном свете. Однако, отношение PsbS-белка к хлорофиллу намного меньше. Оно ближе к отношению РЦ ФСII к хлорофиллу, которое близко к 0.002.

При постоянном pH внутри тилакоида, NPQ линейно возрастает с увеличением концентрации зеаксантина (Björkman and Demmig-Adams, 1995). С другой стороны, при заданной концентрации зеаксантина, NPQ увеличивается с увеличением протонирования, что предполагает пропорциональность зеаксантин-зависимой диссипации энергии произведению (H⁺) на концентрацию зеаксантина. Поскольку концентрация PsbS-белка в тилакоидах не может быть высокой, это свидетельствует об очень сложной зависимости между протонированием и связыванием зеаксантина с этим белком. Действительно, было показано, что кооперативность действия протонов управляет тепловой диссипацией энергии в листьях (Schönknecht и др., 1995).

Недавно было показано, что CO₂, рК которого составляет 6.31 и который выступает в качестве слабого протонирующего агента при высоких концентрациях, способен стимулировать нефотохимическое тушение NPQ у мхов при условии, что присутствует некоторое количество зеаксантина (Bukhov и др., 2001a). Это – удивительный результат, потому что протонирование аминокислот E122 и E226 в PsbS-белке (Li и др., 2002) должно происходить при намного более низком значении pH, чем может обеспечить CO₂. NPQ усиливается, и квантовая эффективность разделения зарядов в РЦ ФСII уменьшается при увеличении концентрации CO₂ (Bukhov и др., 2001a). Освещение действующим светом необязательно. Удаление CO₂ снимает NPQ и увеличивает квантовую эффективность разделения зарядов в РЦ ФСII. Дитиотреитол, ингибитор образования зеаксантина

(Yamamoto и Kamite 1972), ингибирует NPQ, вызванное CO_2 . Все это говорит о том, что протонирование контролирует диссипацию энергии. Присутствие зеаксантина существенно, но наличия нескольких молекул на РЦ ФСII достаточно для эффективной конкуренции с открытыми РЦ за энергию возбуждения (Bukhov и др., 2001a).

Сходные результаты были получены не только на мхах, но и на лишайниках, у которых фотобионтами являются зеленые водоросли. У лишайников с фотобионтами из синезеленых водорослей не наблюдалось обратимого увеличения NPQ при добавлении высоких концентраций CO_2 . Такие лишайники не обладают зеаксантиновым циклом (Demmig-Adams и др., 1990).

Важно отметить, что листья, которые обладают зеаксантиновым циклом, очень медленно реагируют на высокие концентрации CO_2 увеличением NPQ или снижением эффективности разделения зарядов в РЦ ФСII при отсутствии освещения действующим светом. В противоположность этому ответы мхов *Rhytidiadelphus* на CO_2 были быстрыми и резкими (Bukhov и др., 2001b). На рис. 4 сравнивается степень обратимого подавления разделения зарядов под влиянием CO_2 у мха *Rhytidiadelphus* и листьев

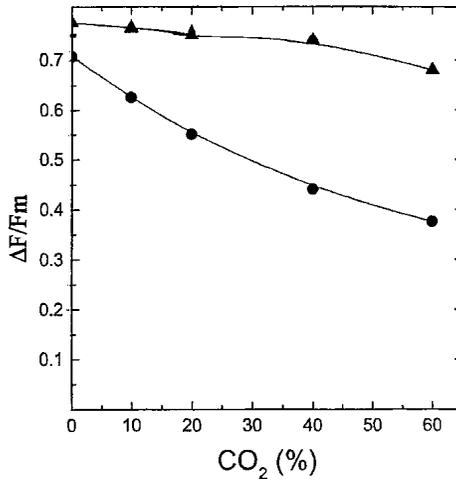


Рис. 4. Зависимость временного разделения зарядов в РЦ ФСII (измеренное как $\Delta F/F_m$) во время 1-с вспышек света от концентрации CO_2 в воздухе у гидратированных *Rhytidiadelphus squarrosus* (●) и листьев шпината (▲). Действующий свет не включали во время опыта, но зеаксантин присутствовал. (Bukhov и др., 2001b)

шпината при отсутствии действующего света. Очевидно, что регуляция зеаксантин-зависимой диссипации энергии посредством протонирования

различается у мхов (а также лишайников, данные не приведены) и высших растений (листья шпината). Также известно, что максимальные скорости фотосинтеза различны в разных группах фотосинтезирующих организмов (Green и Lange, 1995; Lange, 2003 b; Larcher, 2003). Максимальные скорости разделения зарядов в РЦ ФСII, судя по отношению $\Delta F/F_m$, также отличаются. У мхов и лишайников они почти всегда ниже, чем у высших растений (Jensen, 2002). Очевидно, что баланс между запасанием и диссипацией энергии сдвинут в сторону диссипации у многих пойкилогидрических автотрофов, в то время как у высших растений запасание энергии доминирует над диссипацией энергии. Таким образом, создается впечатление, что чувствительность к избыточному свету выше у мхов и лишайников по сравнению с высшими растениями. Более тонкая регуляция тепловой диссипации энергии обеспечивает защиту от окислительного разрушения в этих организмах.

Индукцированная высыханием тепловая диссипация энергии у фотосинтезирующих автотрофов

На рис. 5 показана флуоресценция хлорофилла устойчивых к высыханию мхов *Hypnum cupressiforme* и *Rhytidium rugosum* перед и после их гидратации каплями воды. *Hypnum* собирали в гидратированном состоянии в дождливую погоду в затененных местах. Растения медленно высушивали либо на солнце (рис. 5A), либо в темноте (рис. 5B). *Rhytidium* собирали в сухом состоянии в освещенных местах (рис. 5C). Часть экземпляров этого мха гидратировали и выдерживали в этом состоянии в течение двух дней при слабом свете перед медленным высушиванием в темноте (рис. 5D). Выдерживание растений на слабом свете или в темноте перед высушиванием (рис. 5B и D) было сделано для того, чтобы обеспечить эпоксидацию зеаксантина в виолаксантин (Demmig-Adams, 1990). Было показано, что это превращение легко происходит в гидратированных мхах (Bukhov и др., 2001a). Модулированная флуоресценция хлорофилла была вызвана освещением модулированным измерительным светом очень низкой интенсивности ($0.1 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ или 0.005% солнечного света). Этот свет быстро увеличивал флуоресценцию хлорофилла высушенных мхов до уровня F_0 , который, как известно, отражает уровень флуоресценции в состоянии с преимущественно окисленной электрон-транспортной цепью у гидратированных фотосинтезирующих организмов. Это быстрое возрастание флуоресценции было меньше на рис. 5A и C, чем на рис. 5B и D. Это свидетельствует о том, что флуоресценция хлорофилла сильнее тушится у высушенных на солнце мхов, по сравнению с мхами, высушенными в темноте.

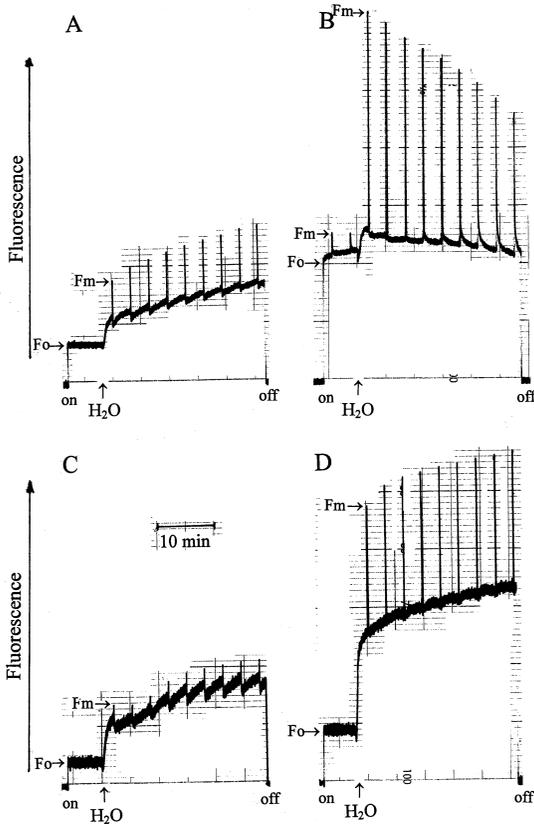


Рис. 5. Модулированная флуоресценция хлорофилла в обезвоженных мхах *Hypnum cupressiforme* (A,B) и *Rhytidium rugosum* (C,D) перед и после гидратирования. (A) и (C) мхи высушены на солнце; (B) и (D) мхи были собраны в гидратированном состоянии, либо гидратированы за два дня до передмедленным высушиванием в темноте. Очень слабый модулированный измерительный свет включали и выключали для записи флуоресценции, показанной на рисунке. Сильные 1-с вспышки света (поток фотонов $13000 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) включали каждые 200 с как перед, так и после гидратирования. В опытах (A), (C) и (D) вспышки не вызвали возрастания флуоресценции до момента гидратирования. Пояснения в тексте

После начального быстрого возрастания флуоресценции до уровня F_0 последующее медленное возрастание наблюдалось только в эксперименте, представленном на рис. 5B, но не на рис. 5A, C и D. Две короткие вспышки очень сильного действующего света ($13\ 000 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$, т.е. в пять раз превышающие интенсивность солнечного света) длительностью 1

с приводили к возрастанию флуоресценции до уровня F_m только на рис. 5B, но не на рис. 5A, C и D у высушенных мхов. Интенсивность этих вспышек была достаточна для возбуждения всех молекул хлорофилла несколько раз, включая молекулы хлорофилла РЦ. Тем не менее они приводили к разделению зарядов, проявляющемуся в виде откликов флуоресценции, только в опыте с *Hypnum*, представленном на рис. 5B, и с дегидрированными листьями таких высших растений, как шпинат (данные не показаны). Это свидетельствует не только о наличии функциональной миграции энергии от светособирающих пигментов к РЦ ФСII даже в обезвоженном состоянии, но также и о разделении зарядов в РЦ и потоке электронов к хиноновому акцептору Q_A РЦ. Тем не менее складывается впечатление, что такое разделение зарядов не наблюдается у высушенных на солнце мхов (рис. 5A и C) и у высушенного в темноте *Rhytidium* (рис. 5D).

Гидратация путем добавления капли воды резко изменяла флуоресцентные ответы. Небольшое быстрое начальное понижение флуоресценции, по-видимому, определяется изменением оптических свойств объекта, но более медленные изменения имеют функциональную основу. Гидратация медленно увеличивала F_0 -уровень флуоресценции во всех случаях. Очевидно что высушивание тушило флуоресценцию и тушение обратимо снималось при гидратации. Индуцированная вспышками света флуоресценция в данном случае свидетельствует о разделении зарядов в РЦ ФСII и переходном восстановлении окисленного Q_A во всех экспериментах. Однако степень разделения зарядов, как видно из $\Delta F/F_m$, была меньше в высушенных на солнце мхах, чем в мхах, высушенных в темноте ($\Delta F/F_m = 0.33$ и 0.15 на рис. 5A и C соответственно и 0.58 и 0.45 на рис. 5B и D соответственно, вскоре после гидратирования). Также временное тушение F_0 после освещения сильными вспышками света наблюдалось только на рис. 5A и C, но не на рис. 5B и D. Такое тушение F_0 после освещения типично для случая зеаксантин-зависимой диссипации энергии. Оно отсутствует на рис. 5B и D, потому что медленное высушивание гидратированных мхов в темноте приводило к преобразованию зеаксантина в виолаксантин (Bukhov и др., 2001a). Как следствие, зеаксантин-зависимая диссипация энергии отсутствовала.

Кинетики тушения F_0 флуоресценции на рис. 5A и C после интенсивных импульсов света показывают очень гибкую регуляцию зеаксантин-зависимой диссипации энергии. Во время коротких вспышек света PsbS-белок протонируется за счет сопряженного с транспортом электронов транспорта протонов. Это усиливает диссипацию энергии и понижает флуоресценцию, когда зеаксантин присутствует, хотя действующий свет отсутствовал после прекращения вспышек света. Последующее медленное депротонирование PsbS-белка в темноте восстанавливает флуоресценцию до уровня F_0 .

Вызванная высущиванием диссипация энергии, как видно из сильного снижения F_0 - и F_m -уровней флуоресценции, широко распространена среди пойкилогидрических фотоавтотрофов. Она наблюдается не только у мхов, но и у лишайников. В то время как у многих лишайников симбионтами служат зеленые водоросли, некоторые лишайники в качестве фотобионтов содержат сине-зеленые водоросли. Только лишайники, связанные с зелеными водорослями, обладают зеаксантиновым циклом (Demmig-Adams и др., 1990). Тем не менее оба типа лишайников проявляют сильное тушение флуоресценции, вызванное высущиванием. На рис. 6 сравнивается модулированная флуоресценция хлорофилла высушенного лишайника с зелеными водорослями *Hypogymnia physodes* и лишайника с цианобактериями *Peltigera neckeri* до начала и после гидратирования. В обоих случаях сильные вспышки света не вызвали флуоресцентных ответов в случае высушенных лишайников. В обоих случаях гидратирование сильно увеличивало флуоресценцию. Обратимые изменения флуоресценции, вызванной импульсами света, свидетельствуют о быстром преобразовании неактивных РЦ ФСII в функциональные РЦ. Непосредственно после вспышек света флуоресценция опускается ниже уровня F_0 только в опыте с *Hypogymnia*, показанном на рис. 6А, но не в опыте с *Peltigera* (рис. 6В).

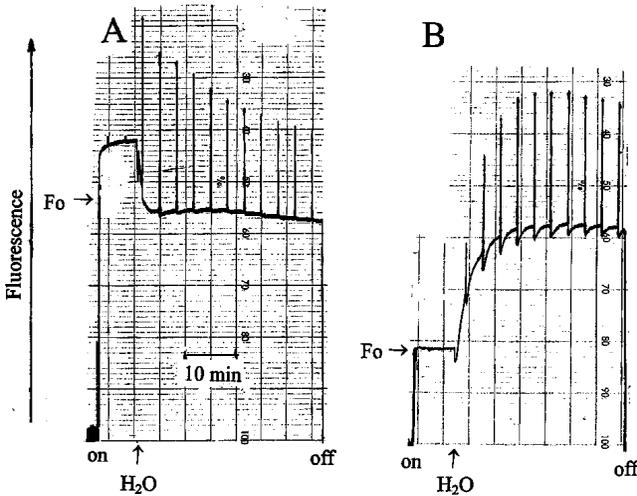


Рис. 6. Модулированная флуоресценция хлорофилла обезвоженного хлоролишайника *Hypogymnia physodes* (А) и обезвоженного цианолишайника *Peltigera neckeri* (В) до и после гидратирования. Сильные 1-с импульсы света давали каждые 200 с как до, так и после гидратирования каплей воды. Следует отметить, что флуоресцентные ответы на вспышки света отсутствовали, когда лишайники находились в сухом состоянии. См. пояснения в тексте

Как обсуждалось выше, временное индуцированное вспышками тушение F_0 типично для случая активного зеаксантин-зависимого пути диссипации энергии. Цианолишайники не имеют зеаксантинового цикла. Согласно Билгеру и соавторам (1989), часть вызванного высушиванием тушения в цианолишайнике *Peltigera rufescens* обусловлена функциональным отсоединением фикобилисом и ФСII, в то время как у хлоролишайника *Ramalina* снижена миграция энергии возбуждения от светособирающего комплекса к РЦ ФСII.

У высших растений вызванная высушиванием тепловая диссипация энергии выражена слабо. Когда высушивали листья шпината, только Fm-уровень флуоресценции существенно снижался, но не уровень флуоресценции F_0 .

Взаимодействие двух путей тепловой диссипации энергии

Для многих пойкилогидрических автотрофов в сухом состоянии конденсированной холодными ночами росы достаточно для гидратации и восстановления метаболической активности. Даже равновесие лишайников и воздуха с повышенной во время ночного похолодания относительной влажностью часто обеспечивает достаточную оводненность для восстановления метаболических процессов (Lange, 2003b). После восхода солнца гидратированные организмы проявляют короткий пик фотосинтетического поглощения CO_2 – до того момента, как постепенное высушивание и увеличивающаяся интенсивность света не сдвинут баланс от исходно преобладающего запасаения энергии в сторону диссипации энергии. Пока гидратация достаточна для поддержания транспорта электронов к CO_2 и альтернативных путей транспорта электронов, подкисление внутритилакоидного пространства может способствовать накоплению зеаксантина и протонитрованию PsbS-белка и таким образом активировать зеаксантин-зависимую диссипацию энергии. Образовавшиеся центры диссипации энергии, по видимому, не только выдерживают постепенное высушивание, но и сохраняют функциональную активность в полностью обезвоженном состоянии. Доказательства этого могут быть получены из спектра флуоресценции, приведенном на рис. 7, который был получен на тех же высушенных мхах, результаты исследования которых представлены на рис. 5. Флуоресценцию возбуждали светом с длиной волны 440 нм. У высушенного на солнце *Hypnum* максимум флуоресценции наблюдался около 720 нм (нижний спектр на рис. 7А), в то время как у высушенного в темноте *Hypnum* максимум свечения приходился на 685 нм и наблюдалось выраженное плечо у 720 нм (верхний спектр на рис. 7А). Сходные наблюдения были получены на мхе *Rhytidium* (рис. 7В). В этом случае высушенный на солнце мох имел два пика флуоресценции сравнимой высоты, один при 685 нм и другой –

сдвинутый в дальнюю красную область (нижний спектр). У высушенного в темноте мха доминировал пик при 685 нм, но более выраженное плечо к дальней красной области свидетельствовало о присутствии центров, излучающих при 720 нм (верхний спектр на рис. 7B).

Из спектра, представленного на рис. 7, видно, что флуоресценция при 685 нм преимущественно тушится у высушенных на солнце мхов, содержащих зеаксантин. Когда высушенные в темноте мхи перед высушиванием обрабатывали таким образом, чтобы исключить накопление зеаксантина, флуоресценция при 685 нм была сильнее, чем флуоресценция при 720 нм. Тем не менее центры, излучающие свет с длиной волны 720 нм, также присутствовали у мхов, высушенных в темноте.

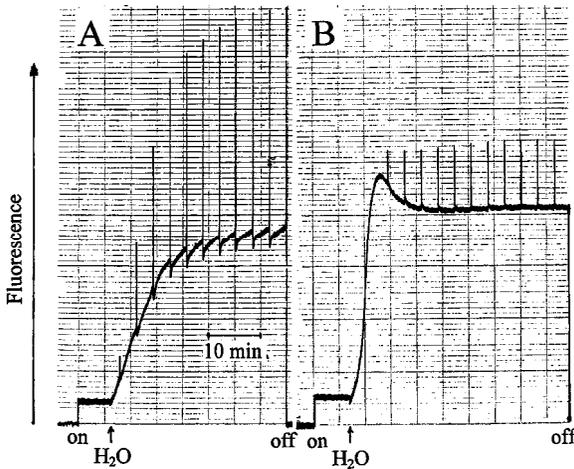


Рис. 7. Спектры флуоресценции обезвоженного мха *Hypnum cupressiforme* (A) и *Rhytidium rugosum* (B). Нижние спектры на (A) и (B) получены на высушенных на солнце обезвоженных мхах, верхние спектры получены на обезвоженных мхах, которые были гидратированы и медленно высушены в темноте. См. пояснения в тексте

В совокупности с данными, представленными на рис. 5, спектральные данные (рис. 7) свидетельствуют о том, что зеаксантин-зависимая тепловая диссипация энергии активирована при соблюдении соответствующих условий не только в гидратированных пойкилогидрических организмах, обладающих зеаксантиновым циклом, но также и после высушивания. Сочетание этого механизма с диссипационным механизмом, вызванным высушиванием, обеспечивает защиту обезвоженных пойкилогидрических автотрофов.

Фотозащитный транспорт электронов в РЦ ФСII в отсутствие воды

В то время как опыты, представленные на рис. 5А, С и D и рис. 6, свидетельствуют об отсутствии разделения зарядов в РЦ ФСII обезвоженных мхов и лишайников, на рис. 5В показано, что при определенных условиях окружающей среды как разделение зарядов, так и транспорт электронов к Q_A активны даже в сухих пойкилогидрических организмах. Очень сходные с представленными для обезвоженного мха *Hypnum* (рис. 5В) данные были получены на высушенном мхе *Rhytidiadelphus squarrosus* и высушенных листьях шпината и других высших растений (которые не переживают регидрирования) или вайях папоротника *Polypodium vulgare* (которые устойчивы к обезвоживанию). Предварительная темновая адаптация перед высушиванием и высушивание в темноте были необходимы для того, чтобы наблюдалось разделение зарядов и восстановление Q_A при очень слабом освещении, т.к. иначе Q_A остается в темноте в восстановленном состоянии или реокисляется очень медленно. Он может длительно поддерживаться в полностью восстановленном состоянии при освещении светом низкой интенсивности. В этом случае другие фотореакции ФСII можно отличить от транспорта электронов к Q_A при помощи спектрального анализа (Shuvalov и Heber, 2003). Светозависимое выцветание bleaching в области 500 нм показало, что β -каротин (Car), входящий в состав РЦ ФСII, фотоокислялся с низким квантовым выходом не только у высушенных листьев шпината (рис. 8), но также и в высушенных хлоропластах шпината и субхлоропластных частицах. Окисление было почти пропорционально интенсивности света, вплоть до интенсивностей, близких к солнечному свету. Об этом же свидетельствует и образование полосы поглощения в области около 1000 нм. В то время как β -каротин находился в фотоокисленном состоянии, кинетически сходное образование полос при 450 и 810 нм и выцветание при 436 и 680 нм свидетельствуют о накоплении восстановленного хлорофилла. Эффекты проскока (сита), более сильно проявляющиеся на синем свету по сравнению с зеленой областью спектра, затрудняют количественный анализ взаимосвязи восстановления хлорофилла с окислением каротина в сухих листьях. Однако спектры, полученные на субхлоропластных частицах, дают отношение Chl/Car^+ , близкое к 1. При поддержании Q_A в восстановленном состоянии никаких признаков фотонакопления восстановленного феофитина не было получено. Выцветание в области 540 нм свидетельствовало о том, что фотонакопление $Pheo^-$ происходит лишь после подавления переноса электронов на Q_A путем предварительной тепловой обработки листьев в гидратированном состоянии при 60° С до начала высушивания. Кроме того, не было обнаружено редокс-зависимых изменений абсорбции в области 559 нм, что свидетельствовало от том, что цитохром b559 в РЦ ФСII

оставался в окисленном состоянии, в то время как наблюдались обратимые окислительно-восстановительные реакции с участием β -каротина и хлорофилла. При выключении света Ca^+ окислялся и Chl^- окислялся с полувременими до 1 с (Shuvalov и Heber, 2003).

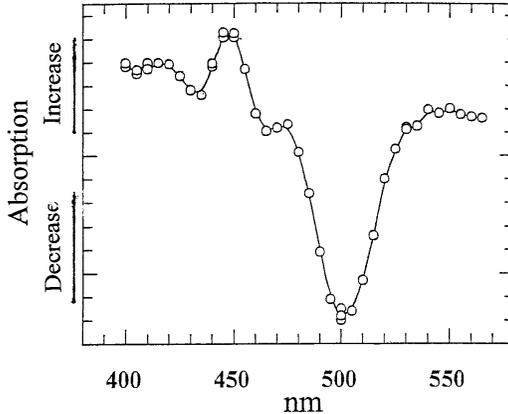


Рис. 8. Разностный спектр свет-темнота сухого листа шпината. Из-за сильного эффекта проскока, особенно выраженного в голубой области спектра, положительная полоса поглощения при 450 нм была сильно подавлена по сравнению с выцветанием полосы каротина при 500 нм. Выцветание при 500 нм уменьшало поглощение на $\Delta A = 3 \times 10^{-3}$

Эти данные были интерпретированы как свидетельство того, что первичным акцептором электронов в РЦ ФСII является хлорофилл, примыкающий к P680, а не феофетин, который до недавнего времени рассматривался как первичный акцептор электронов у высших растений (Shuvalov и Heber, 2003). В сухих листьях разделение зарядов в ФСII приводило к начальному образованию радикальной пары $\text{P680}^+\text{Chl}^-$. Как рекомбинация к состоянию P680Chl , так и окисление Ca^+ при участии P680^+ понижает стационарную концентрацию сильного окислителя P680^+ . После стадии окисления Ca^+ происходит восстановление Ca^+ при участии Chl^- , что завершает цикл электрона в РЦ ФСII. Поскольку быстрая рекомбинация радикальной пары и циклический транспорт электронов в РЦ ФСII понижают концентрацию P680^+ , оба процесса вносят вклад в фотозащиту в условиях, когда другие механизмы, например, вызванная высушиванием зеаксантин-зависимая диссипация энергии, недостаточно эффективны для предотвращения разделения зарядов в РЦ. Они помогают предотвратить неспецифическое окисление компонентов ФСII под действием P680^+ .

Спектры пропускания очень сходны со спектром, показанным на рис. 8 для сухих листьев шпината, были также получены на пойкилогид-

рическом папоротнике *Polypodium vulgare* (Shuvalov и Heber, 2003) и на обезвоженном мхе *Rhytidiadelphus squarrosus*, но только в тех случаях, когда мох был медленно высушен в темноте. Из-за сильного эффекта проскока спектры для папоротников и мхов имели хорошее разрешение только в области 500 нм. Попытки зарегистрировать спектры от высушенных на солнце мхов не увенчались успехом, потому что разделение зарядов в РЦ было подавлено вследствие сильной диссипации энергии, вызванной высушиванием (см. также рис. 5А и С).

Поскольку лишайники не пропускают свет, информация об их фотореакциях может быть получена только по отражению света. В связи с сильным вызванным высушиванием тушением для анализа было необходимо применять очень высокие плотности потока фотонов. В этой ситуации наблюдалось светозависимое образование полосы около 810 нм. Темновая релаксация этой полосы имела несколько фаз. Поскольку в этой области поглощают как хлорофилл-катионы, так и хлорофилл-анионы, невозможно достоверно определить природу этого процесса.

Образование полосы наблюдалось также около 875 нм. Эта полоса увеличивалась пропорционально интенсивности света, аналогично окислению каротина в сухих листьях шпината (Shuvalov и Heber, 2003). При 875 нм, окисление каротина имело колебательную полосу (Tracewell и др., 2001). Полувермя темновой релаксации этой полосы составляло от 500 мс до 1 с. Поскольку это соответствовало скоростям восстановления фотоокисленного каротина в сухом шпинате, увеличение поглощения при 875 нм, возможно, связано с Ca^{2+} . Если это справедливо, циклический поток электронов в РЦ ФСII, который наблюдался в сухих листьях шпината, также функционирует в обезвоженных лишайниках и мхах. Это может вносить вклад в фотозащиту, хотя в значительно меньшей степени, чем вызванная высушиванием тепловая диссипация энергии, которая вместе с зеаксантин-зависимой диссипацией энергии является доминирующим фактором регуляции фотозащиты у пойкилогидрических автотрофов.

Заключительные замечания

В течение первого десятилетия современных исследований фотосинтеза основной упор делался на выяснение принципиальных путей транспорта электронов и восстановления CO_2 и других физиологических акцепторов электронов. Позднее, значительное внимание было направлено на механизмы регуляции этих путей. В центр интересов всегда попадали вопросы использования энергии света в биосинтетических целях, хотя достаточно рано было установлено, что свет может также повреждать фотосинтетический аппарат. Все без исключения мутанты, лишённые каротиноидов, не способны переносить освещение в содержащей кислород ат-

мосфере. Известно также, что агенты, препятствующие биосинтезу каротиноидов, являются эффективными гербицидами. Хотя это подчеркивает роль каротиноидов в обеспечении защиты от светосенсибилизированного окисления, существование физиологических механизмов, способных регулировать не только фотосинтез, но также и тепловую деградацию световой энергии, оставалось незамеченным до тех пор, пока флуоресценция не стала широко использоваться в исследованиях фотосинтеза. Тогда стало очевидным, что медленные изменения флуоресценции хлорофилла не только связаны с фотохимическим использованием света, но также содержат информацию о до сих пор неизвестных механизмах, вовлеченных в защиту фотосинтетического аппарата от повреждения радикалами (Krause и Weis, 1991; Krause и Jahns, 2003). На рис. 9 представлены потоки энергии возбуждения в гидратированных и обезвоженных пойкилогидрических фотосинтетических организмах. Когда вода присутствует в достаточном количестве и поток фотонов мал, энергия света, поглощенная светособирающей пигментной системой ФСII, захватывается в основном РЦ ФСII, где происходит разделение зарядов, инициирующее запасание энергии в форме разделенных зарядов. Вода окисляется, и выделяется кислород (рис. 2). Зеаксантин-зависимая тепловая диссипация энергии активируется в антенне ФСII только при более высоких плотностях потока фотонов в связи с протонированием PsbS-белка. Это происходит, когда альтернативные процессы транспорта электронов понижают pH внутри тилакоида, делая возможной протонирование белка. Так регулируется тепловая диссипация энергии. Однако существенным условием является присутствие зеаксантина (Bukhov и др., 2001a). Формирование комплекса между протонированным PsbS-белком и зеаксантином сдвигает поглощение зеаксантина в сторону более длинных длин волн (Aspinall-O'Dea и др., 2002). Каким образом это приводит к формированию диссипативных центров, способных эффективно конкурировать с открытыми РЦ ФСII за энергию возбуждения (рис. 4), все еще предстоит выяснить.

Потеря воды во время обезвоживания пойкилогидрических автотрофов активирует другой механизм тепловой диссипации энергии. Это проявляется в сильном снижении флуоресценции хлорофилла, хорошо обратимом при гидрировании (рис. 5 и 6). Ничего не известно о молекулярных деталях вызванного высушиванием механизма. Можно высказать предположение, что потеря воды во время обезвоживания приводит к конформационным изменениям белка ФСII, которые превращают его в диссипативный центр. В результате этого функционирующие РЦ ФСII превращаются в нефункционирующие. Такое сильное влияние на функционирование РЦ обусловлено тем, что функциональные изменения происходят, скорее всего, вблизи РЦ или даже в пределах самого РЦ. Однако нельзя исключать расположение диссипативного центра в антенне. На-

блюдаемые у мхов сезонные различия в вызванной высушиванием тепловой диссипацией энергии свидетельствуют о том, что существуют механизмы регуляции формирования диссипативных центров.

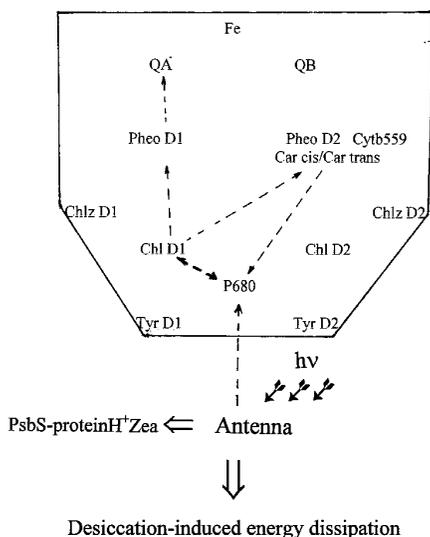


Рис. 9. Схема диссипации энергии возбуждения у пойкилогидрических автотрофов. Локализация пигментов в РЦ приведена в соответствии с Kamiya и Shen (2003). D1 и D2 относятся к белкам РЦ.

До тех пор, пока организмы находятся в гидратированном состоянии, основной механизм диссипации избыточной световой энергии связан с протонированием PsbS белка в антенне ФСII. Этот механизм требует присутствия зеаксантина. Доминирующий механизм сдвигается в сторону вызванного обезвоживанием механизма тепловой диссипации энергии в тех организмах, которые проявляют сильное тушение флуоресценции во время высыхания. Малую роль играет рекомбинация $P680^+$ и Chl $^-$ в $P680Chl^-$ и циклический перенос электронов внутри РЦ. Он может играть важную роль у тех пойкилогидрических автотрофов, которые не обладают хорошо развитыми механизмами вызванного обезвоживанием тушения флуоресценции

В заключение отметим, что рекомбинация зарядов и циклический поток электронов в функционирующих РЦ может, путем понижения стационарных концентраций сильного окислителя $P680^+$, снижать опасность неспецифических окислительных реакций в обезвоженных фотосинтетических организмах. Эти реакции помечены пунктирными стрелками на рис. 9. При приближении плотности потока фотонов к солнечному свету, хорошо проявляется окисление β -каротина в растениях шпината, пойки-

логидрического папоротника *Polypodium vulgare* (Shuvalov и Heber, 2003) и для мха *Rhytidiadelphus squarrosus* (неопубликованные данные), когда последний организм находился в фоточувствительном состоянии. Оно не наблюдалось у фотоустойчивых мхов и лишайников, у которых вызванная высушиванием диссипация энергии была достаточно сильной (рис. 5 и 6), чтобы маскировать реакции РЦ при плотностях потока фотонов, соответствующих солнечному свету.

Благодарности

Наше исследование было поддержано Deutsche Forschungsgemeinschaft, Фондом химической индустрии, Российской Академией Наук и Российским Фондом Фундаментальных Исследований. Мы благодарны доктору Целлнеру, Институт Юлиуса фон Сакса, Вюрцбургский Университет, за помощь в определении видов мхов.

Литература

- Alpert, P. (2000) The discovery, scope, и puzzle of desiccation tolerance in plants. *Plant Ecology* 151, 5-17.
- Arnon, D.I. (1977) Photosynthesis 1950-1975: Changing concepts и perspectives. In: Trebst, A., Avron, M. (eds.) *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, vol. 5, pp. 7-56, Springer, Berlin.
- Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens и dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 601–639.
- Aspinall-O’Dea M., Wentworth, M., Pascal, A., Robert, B., Ruban, A., Horton, P. (2002) In vitro reconstitution of the activated zeaxanthin state associated with energy dissipation in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 16331-16335
- Bilger, W., Rimke, S., Schreiber, U., и Lange, O.L. (1989) Inhibition of energy transfer to photosystem II in lichens by dehydration: different properties of reversibility with green и blue-green photobionts. *J. Plant Physiol.* 134, 261-268
- Björkman, O., Demmig, B. (1987) Photon yield of O₂ evolution и chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origin. *Planta* 170, 489-504
- Björkman, O. и Demmig-Adams, B. (1995) Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion, и dissipation in leaves of higher plants. In: *Ecophysiology of Photosynthesis* (eds. Schulze, E.-D. и Caldwell, M.M.), *Ecological Studies* 100, pp. 17-47. Springer, Berlin.

- Bradbury, M., Baker, N.R. (1981) Analysis of the slow phase of the in vivo fluorescence induction curve. Changes in the redox state of photosystem II electron acceptors и fluorescence emission from photosystems I и II. *Biochim. Biophys. Acta* 635, 542-551
- Bukhov N.G., Kopecky, J., Pfündel, E.E., Klughammer, C., Heber, U. (2001a) One molecule of zeaxanthin per reaction centre of photosystem II permits effective thermal dissipation of light energy in a poikilohydric moss. *Planta* 212, 739-748
- Bukhov, N.G., Heber, U., Wiese, C., Shuvalov, V.A. (2001b) Energy dissipation in photosynthesis: quenching of chlorophyll fluorescence in reaction centers и antenna complexes. *Planta* 212, 749-758
- Demmig, B., Winter, K., Krüger, A., Czygan, F.-C. (1987) Photoinhibition и zeaxanthin formation in intact leaves. A possible role of the zeaxanthin cycle in the dissipation of excess light energy. *Plant Physiol.* 84, 218-224
- Demmig-Adams, B. (1990) Carotenoids и photoprotection of plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim. Biophys.-Acta* 1020, 1-24
- Demmig-Adams, B., Máguas, C., Adams III, W.W., Meyer, A., Kilian, E. и Lange, O.L. 1990. Effect of high light on the efficiency of photochemical energy conversion in a variety of lichen species with green и blue-green phycobionts. *Planta* 180, 400-409.
- Demmig-Adams, B., Green, T.G.A., Czygan, F.-C., Lage, O.L. (1990) Differences in the susceptibility to light stress in two lichens forming a phycosymbiodeme, one partner possessing и one lacking the zeaxanthin cycle. *Oecologia* 84, 451-456
- Evans, D.E., Lange, O.L. (2003) Biological soil crusts и ecosystem nitrogen и carbon dynamics. In: Belnap, J., Lange, O.L. (eds.) *Biological Soil Crusts: Structure, Function, и Management*. Ecological Studies 150, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 263-279.
- Gaff, D.F. (1997) Mechanisms of desiccation tolerance in resurrection vascular plants. In: Basra, A.S., Basra, R.K. (eds.) *Mechanisms of environmental stress resistance in plants.*, pp. 43-58, Harwood Acad. Publ., London
- Gauslaa, Y. и Solhaug, K. A. (1999). High-light damage in air-dry thalli of the old forest lichen *Lobaria pulmonaria* –interactions of irradiance, exposure duration и high temperature. *J. Exp. Bot.* 50, 697-705.
- Gauslaa, Y., Ohlson, M., Solhaug, K. A. Bilger, W. и Nybakken, L. (2001). Aspect-dependent high-irradiance damage in two transplanted foliose forest lichens, *Lobaria pulmonaria* и *Parmelia sulcata*. *Can. J. For. Res.* 31, 1639-1649.
- Gauslaa, Y. и Solhaug, K. A. (2004). Photoinhibition in lichens depends on cortical characteristics и hydration. *Lichenologist* 36, 133-143.
- Gilmore, A.M. и Govindjee (1999) How higher plants respond to excess light: energy dissipation in photosystem II. In: Singhal, G.S., Renger, G., Sopory,

- S.K., Irrgang, K.-D. и Govindjee (eds). Concepts in photobiology: photosynthesis и photomorphogenesis. Narosa Publ. House, New Delhi, pp 513-548
- Genty, B., Briantais, J.-M., Baker, N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport и quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990, 87-92
- Green, T.G.A., Lange, O.L. (1995) Photosynthesis in poikilohydric plants: a comparison of lichens и bryophytes. In: *Ecophysiology of Photosynthesis* (eds. Schulze, E.-D. и Caldwell, M.M.), *Ecological Studies* 100, pp. 319-341. Springer, Berlin.
- Hager, A. (1969) Lichtbedingte pH-Erniedrigung in einem Chloroplasten-Kompartiment als Ursache der enzymatischen Violaxanthin→Zeaxanthin-Umwilung: Beziehungen zur Photophosphorylierung. *Planta* 89, 224-243
- Naraux, F., de Kouchkovsky, Y. (1998) Energy coupling и ATP synthase. *Photosynth. Res.* 57, 231-257
- Heber, U. (2003) Irrungen, Wirrungen? The Mehler reaction in relation to cyclic electron transport in C3 plants. *Photosynth. Res.* 73, 223-231
- Heber, U., Bilger, W., Bligny, R., Lange, O.L. (2000) Photoreactions in two lichens, a poikilohydric moss и higher plants in relation to phototolerance of alpine plants: a comparison. *Planta* 211, 770-780
- Heber, U., Bligny, R., Streb, P., Douce, R. (1995) Photorespiration is essential for the protection of the photosynthetic apparatus of C3 plants against photoinactivation under sunlight. *Bot. Acta* 109, 307-315
- Heber U, Bukhov NG, Shuvalov VA, Kobayashi Y, Lange OL (2001) Protection of the photosynthetic apparatus against damage by excessive illumination in homoiohydric leaves и poikilohydric mosses и lichens. *J. Exp Bot* 52: 1999-2006
- Jensen, M. (2002) Measurement of chlorophyll fluorescence in lichens. In: Kranner, I., Beckett, R. & Varma, A. (eds.) *Protocols in Lichenology*. Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, pp. 135-151
- Joliot, P., Joliot, A. (2002) Cyclic electron transfer in plant leaf. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 10209-10214
- Kamiya, N., Shen, J.-R. (2003) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 98-103
- Kitajima, K., Butler, W. (1975) Quenching of chlorophyll fluorescence и primary photochemistry in chloroplasts by dichromothymoquinone. *Biochim. Biophys. Acta* 376, 105-115
- Kobayashi, Y., Kaiser, W., Heber, U. (1995) Bioenergetics of carbon assimilation in intact chloroplasts: coupling of proton to electron transport at the ratio $H^+/e = 3$ is incompatible with $H^+/ATP = 3$ in ATP synthesis. *Plant Cell Physiol.* 36, 1629-1637

- Krause, G.H., Weis, E. (1991) Chlorophyll fluorescence и photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 313-349
- Krause, G.H., Jahns, P. (2003) Pulse amplitude modulated chlorophyll fluorometry и its application in plant science. In: Green, B. R., Parson, W.W. (eds.) *Light-harvesting Antennas in Photosynthesis*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, pp. 373-399
- Lange, O.L., Green, T.G. A., Heber, U. (2001) Hydration-dependent photosynthetic production of lichens: what do laboratory studies tell us about field performance? *J. Exp. Bot.* 52, 2033-2042
- Lange, O.L. (2003a) Photosynthetic productivity of the epilithic lichen *Lecanora muralis*: long-term field monitoring of CO₂ exchange и its physiological interpretation. II. Diel и seasonal patterns of net photosynthesis и respiration. *Flora* 198, 233-249
- Lange, O.L. (2003b) Photosynthesis of soil-crust biota as dependent on environmental factors. In: Belnap, J., Lange, O.L. (eds.) *Biological Soil Crusats: Structure, Function и Management*. Springer, Berlin, pp. 217-240
- Larcher, W. (2003) *Physiological Plant Ecology. Ecophysiology и Stress Physiology of Functional Groups*. Springer, Berlin.
- Li X.-P., Phippard, A., Pasari, J., Niyogi, K.K. (2002) Structure-function analysis of photosystem II subunit S (PsbS) in vivo. *Functional Plant Biol.* 29, 1131-1139
- Ma, Y.-Z., Holt, N.E., Li, X.-P., Niyogi, K.K. & Fleming, G.R. (2003) Evidence for direct carotenoid involvement in the regulation of photosynthetic light harvesting *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4377-4382
- Mehler, A.H. (1951) Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanisms of the reduction of oxygen и other Hill reagents. *Arch. Biochem. Biophys.* 33, 65-77
- Niyogi, K.K. (1999) Photoprotection revisited: genetic и molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 333-359
- Owens, T.G. (1996) Processing of excitation energy by antenna pigments. In: Baker, N.R. (ed.) *Photosynthesis и the Environment.*, pp. 1-23, Kluwer, Dordrecht
- Pfündel, E.E., Dilley, R.A. (1993) The pH-dependence of violaxanthin deepoxidation in isolated pea chloroplasts. *Plant Physiol.* 101, 65-71
- Ruban, A.V., Pascal, A.A., Robert, B. & Horton, P. (2002) Activation of zeaxanthin is an obligatory event in the regulation of photosynthetic light harvesting. *J. Biol. Chem.* 277, 7785-7789
- Rumberg, B., Schubert, K., Strelow, F., Tran-Anh, T. (1990) The H⁺/ATP coupling ratio at the H⁺-ATP-synthase of spinach chloroplasts is four. In: Baltscheffsky, M. (ed.) *Current Research in Photosynthesis III*, pp. 125-128, Kluwer Academic Publ., Dordrecht

- Sapozhnikov, D.J., Kolotova, L.R., Giller, Y.E. (1966) Action spectrum of de-epoxidation of violaxanthin. Dokl. Akad. Nauk SSSR 171, 740-741
- Schönknecht, G., Neimanis, S., Katona, E., Gerst, U., Heber, U. (1995) The relationship between photosynthetic electron transport и the trans-thylakoid proton gradient in intact leaves. Proc. Nat. Acad. Sci. New York 92, 12185-12189
- Schreiber, U., Schliwa, U., и Bilger, W. (1986) Continuous recording of photochemical и non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. Photosynth. Res. 10, 51-62
- Schreiber, U., Klughammer, C., Neubauer, C. (1988) Measuring P700 absorbance changes around 830 nm with a new type of pulse modulation system. Z. Naturforschg. 43c, 686-698
- Schreiber, U., Bilger, W. (1993) Progress in chlorophyll fluorescence research: major developments during the past years in retrospect. Progress in Botany 54, 151-153
- Shuvalov, V.A. и Heber, U. (2003) Photochemical reactions in dehydrated photosynthetic organisms, leaves, chloroplasts и photosystem II particles: Reversible reduction of pheophytin и chlorophyll и oxidation of β -carotene. Chem. Phys. 294, 227-237
- Siefermann-Harms, D. (1987) The light harvesting и protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. Physiol. Plant. 69, 561-568
- Tracewell, C.A., Vrettos, J.S., Bautista, J.A., Frank, H.A., Brudwig, G.W. (2001) Carotenoid photooxidation in photosystem II. Arch. Biochem. Biophys. 385, 61-69
- Vermaas, W. (1993) Molecular-biological approaches to analyze photosystem II structures и functions. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44, 457-481
- Wentworth, M., Ruban, A.V. и Horton, P. (2003) Thermodynamic investigation into the mechanisms of the chlorophyll fluorescence quenching in isolated photosystem II light harvesting complexes. J. Biol. Chem. 278, 21845-21850
- Yamamoto, H.Y., Nakayama, T.O.M., Chichester, C. O. (1962) Studies on the light и dark interconversions of leaf xanthophylls. Arch. Biochem. 97, 168-173
- Yamamoto, H.Y., Kamite, L. (1972) The effects of dithiothreitol on violaxanthin de-epoxidation и absorbance changes in the 500 nm region. Biochim. Biophys. Acta 267, 538-543