

УДК 582.26/27:581.9

А.В. ПОЛИЩУК, А.А. ВОЙЦЕХОВИЧ

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,
ул. Терещенковская, 2, 01001 Киев, Украина

ОСОБЕННОСТИ ФОТОСИНТЕЗА НЕКОТОРЫХ ЗЕЛЁНЫХ СВОБОДНОЖИВУЩИХ И ЛИХЕНИЗИРОВАННЫХ НАЗЕМНЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ

Исследованы особенности фотосинтеза 6 штаммов зелёных водорослей, из которых *Radiococcus signiensis* (Broady) Kostikov et al. и *Trebouxia australis* A. Beck являются фотобионтами лишайников, а *Diplosphaera chodatii* Bial., *Parietochloris ovoideus* Mikhailyuk et Demchenko, *Myrmecia bisecta* Reisingl и *Trentepohlia* sp. – свободноживущие наземные водоросли. Выявлены штаммы с высокой и низкой чувствительностью к интенсивности света. Определена оптимальная интенсивность света для культивирования исследованных штаммов: для *Trentepohlia* ≤ 100 мкЕ/(м²·с), *Radiococcus* и *Trebouxia* ≤ 200 мкЕ/(м²·с), *Parietochloris* ≤ 400 мкЕ/(м²·с), *Diplosphaera* и *Myrmecia* ≤ 800 мкЕ/(м²·с). Установлено, что исследованные водоросли имеют различную способность к тепловому рассеиванию избыточного света. Согласно функциональным показателям фотосинтетического аппарата, *Trentepohlia* sp., *R. signiensis* и *T. australis* являются уязвимыми в отношении света, в то время как *M. bisecta*, *P. ovoideus* и *D. chodatii* – светолюбивые водоросли.

Ключевые слова: фотосинтез, *NPQ*, *qI*, интенсивность света, *Trebouxia*, *Trentepohlia*, *Myrmecia*, *Diplosphaera*, *Radiococcus*, *Parietochloris*, зелёные водоросли, фотобионты лишайников, адаптация.

Введение

Зелёные наземные водоросли – неотъемлемые компоненты экосистем. Наряду с другими организмами они принимают активное участие в биодеструкции, почвообразовании и насыщении атмосферы кислородом. Некоторые из них являются постоянными или же временными симбионтами других организмов, например лишайникообразующих грибов. Учёными разных стран активно ведутся исследования особенностей физиологии свободноживущих и лишайнизированных водорослей, в частности механизмов их защиты от высыхания, переувлажнения, высокой инсоляции и низкой температуры (Kappen, Lange, 1970; Demmig-Adams, Adams, 1996; Krause, Jahns, 2004; Fernández-Marín et al., 2009, 2010; Karsten, Holzinger, 2012). Наиболее исследован в этом отношении распространённый в лишайниках фотобионт *Trebouxia* Ruum., тогда как представители других родов наземных водорослей менее изучены или не изучены вообще.

В немалой степени это связано с тем, что для идентификации большинства наземных водорослей необходимо выделение их в культуру, а

© А.В. Полищук, А.А. Войцехович, 2014

наличие чистых культур фотобионтов является обязательным условием при исследовании их состава, таксономии, генетических, физиологических и биохимических особенностей, а также коспецифичности с лишайникообразующим грибом (Войцехович и др., 2011; Войцехович, 2013). Более того, длительные исследования в лабораторных условиях часто усложнены различными требованиями тех или иных водорослей к условиям культивирования. Например, для успешного культивирования разные виды рода *Trebouxia* требуют различной температуры. Так, *T. simplex* Tscherm.-Woess лучше растёт при температуре до 10 °С, тогда как оптимальная температура для большинства других видов данного рода 18–21 °С (Tschermak-Woess, 1988, 1989). Кроме того, результаты ранее проведенного нами анализа содержания хлорофиллов *a* и *b*, β-каротина и ксантофиллов у представителей зелёных водорослей-фотобионтов родов *Asterochloris* Tscherm.-Woess, *Myrmecia* Printz, *Trebouxia* и *Trentepohlia* C.F.P. Martius показали гетерогенность пигментного состава как на родовом, так и на видовом уровне (Войцехович, Кашеваров, 2010), что также указывает на необходимость различных условий содержания в культуре этих водорослей. В одном из литературных источников (Friedl, Büdel, 2008) указано, что культуры фотобионтов требуют «умеренной интенсивности света – 10–30 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ ПФФП (плотность фотосинтетического фотонного потока)». По нашему мнению, это слишком узкий диапазон для культивирования. Таким образом, исследования физиологических и биохимических особенностей наземных водорослей в культуре необходимы для установления оптимальных условий культивирования данных организмов и выявления возможной корреляции данных особенностей с экологией исследуемых водорослей в природных условиях.

Цель данной работы – исследование фотосинтетических особенностей некоторых зелёных свободноживущих и лишайнизированных водорослей в условиях культуры, а также поиск оптимальной интенсивности света для их продолжительного культивирования в лабораторных условиях.

Материалы и методы

Объектом нашего исследования были 6 штаммов зелёных наземных водорослей, из которых *Radiococcus signiensis* и *Trebouxia australis* являются фотобионтами лишайников (Beck, 2002; Войцехович и др., 2011; Voytsekhovich et al., 2011). *Diplosphaera chodatii*, *Parietochloris ovoideus*, *Myrmecia bisecta* и *Trentepohlia* sp. – в основном свободноживущие наземные водоросли, встречающиеся преимущественно аэрофитно на различных субстратах (Ettl, Gärtner, 1995; Algae ..., 2011). Список исследованных штаммов приведен ниже.

Изоляцию фотобионтов проводили методом микропипетки (Ahmadjian, 1993). Культуры водорослей выращивали на агаризованной среде Болда (3NBVM) при интенсивности освещения 10 мкмоль·м⁻²·с⁻¹

ПФФП и температуре воздуха 15 ± 2 °С, с 12-часовым чередованием светового и темного периодов. Предварительную идентификацию и контроль чистоты штаммов осуществляли при помощи микроскопа Микмед-2 вар. 2 (ЛОМО, Россия) на всех стадиях жизненного цикла водорослей. Использовали культуры одного возраста, что позволило провести сравнение полученных результатов. Все штаммы, за исключением *Trebouxia australis* SAG 22.05), поддерживаются в личной коллекции автора к.б.н. Войцехович А.А. и могут быть предоставлены по требованию.

Список исследованных штаммов водорослей

<i>Diplosphaera chodatii</i>	Украина, Закарпатская обл., Тячевский р-н, Карпатский биосферный заповедник (КБЗ), на гнилой древесине среди мхов, эпифит лишайника <i>Placynthiella dasaea</i> (Stirt.) Khodosovtsev. Изолирован в культуру А.А. Войцехович (штамм AV39)
<i>Myrmecia bisecta</i>	Украина, Херсонская обл., Цюрупинский р-н, НПП «Олешковские пески», на песке, эпифит лишайника <i>Placynthiella icmalea</i> (Ach.) Coppins & P. James. Изолирован в культуру А.А. Войцехович (AV38)
<i>Parietochloris ovoideus</i>	Украина, Луганская обл., Свердловский р-н, на почве среди мхов, эпифит лишайника <i>Placynthiella uliginosa</i> (Schrad.) Coppins & P. James. Изолирован в культуру А.А. Войцехович (AV37)
<i>Radiococcus signiensis</i>	Украина, Закарпатская обл., Тячевский р-н, КБЗ, на гнилой древесине, фотобионт лишайника <i>Placynthiella icmalea</i> . Изолирован в культуру А.А. Войцехович (AV22)
<i>Trebouxia australis</i>	Австралия, окрестности г. Канберра, хребет Бриндабелла, фотобионт лишайника <i>Tremolecia atrata</i> (Ach.) Hertel. Изолирован в культуру А. Бэком (SAG 22.05)
<i>Trentepohlia</i> sp.	Украина, Житомирская обл., г. Житомир, скала Голова Чацкого, эпилитная водоросль поверхности и трещин каменистых обнажений. В затенении. Изолирован в культуру Т.И. Михайлюк (AV42)

Функциональные параметры фотосинтетического аппарата исследовали по кривой индукции флуоресценции хлорофилла *a* при помощи флуорометра Хе-РАМ (“Walz”, Германия). Рассчитывали максимальный потенциальный квантовый выход фотосистемы II (F_v/F_m), скорость линейного электронного транспорта (J) при интенсивности действующего света от 25 до 800 мкмоль·м⁻²·с⁻¹, суммарное нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла (NPQ), а также коэффициент фотоинги-

бирования (qI) (Manrique et al., 1989; Brestic, Zivcak, 2013). Измерения проводили при относительной влажности воздуха 45 %.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного нами исследования выявлены виды с высокой и относительно низкой чувствительностью к свету, а также определена оптимальная интенсивность освещения для исследованных штаммов. Так, согласно полученным данным (рис. 1), максимальная скорость фотосинтеза у штамма *Trentepohlia* sp. 50 отн. ед. зафиксирована при низкой освещенности ~ 100 мкмоль·м⁻²·с⁻¹, тогда как повышение интенсивности света вызывало фотохимическое повреждение данного штамма.

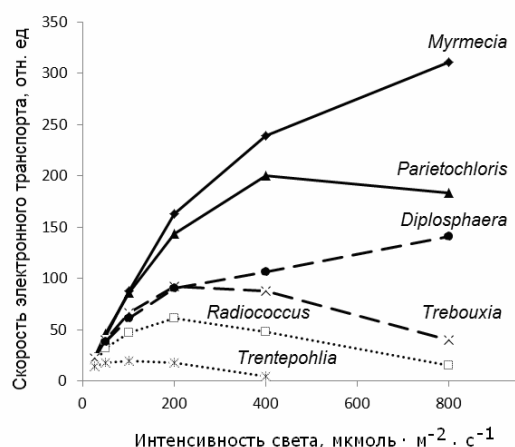


Рис. 1. Зависимость скорости электронного транспорта от интенсивности света

У штаммов *Radiococcus signiensis* и *Trebouxia australis* при увеличении интенсивности света скорость фотосинтеза возрастала до 60 и 90 отн. ед. соответственно, а спад фотосинтетической активности наблюдался при интенсивности света более 200 мкмоль·м⁻²·с⁻¹. В противоположность им, *Diplosphaera chodatii* и *Myrmecia bisecta* продолжали активно фотосинтезировать даже после увеличения интенсивности света до 800 мкмоль·м⁻²·с⁻¹. Максимальная скорость электронного транспорта у *D. chodatii* составляла 140 отн. ед., у *M. bisecta* — 310, а у *Parietochloris ovoideus* — 200 отн. ед.

Максимальный квантовый выход фотосистемы II имел высокие значения у относительно светолюбивых видов родов *Parietochloris*, *Diplosphaera* и *Myrmecia* — 0,64–0,68, тогда как тенелюбивые виды родов *Trentepohlia*, *Radiococcus* и *Trebouxia* характеризовались значительно меньшим уровнем F_w/F_m — 0,54–0,55. Такие низкие значения этой величины свидетельствуют о повышенном уровне стресса исследуемого объекта в условиях роста.

Регуляция эффективности преобразования энергии света наиболее результативно осуществляется на самых ранних этапах — при поглощении света пигмент-белковыми светособирающими комплексами. В процессе нефотохимического тушения избыточная энергия света преобразуется в тепловую. Степень активации или подавления нефотохимического тушения регулируются специфическими ферментными системами и зависит от интенсивности света и готовности клетки его утилизировать. Результаты наших исследований показали, что изученные нами штаммы обладают различной способностью к тепловому рассеиванию избыточной энергии света и четко разделяются на две группы. Так, у штаммов родов *Myrmecia*, *Diplosphaera*, *Parietochloris* и *Trebouxia* при повышении интенсивности света до $800 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ включительно коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла постепенно увеличивается до $0,5 \sim 0,7$ (рис. 2). У штаммов *Radiococcus* и *Trentepohlia* при тех же значениях интенсивности света этот коэффициент не превышает $0,2$.

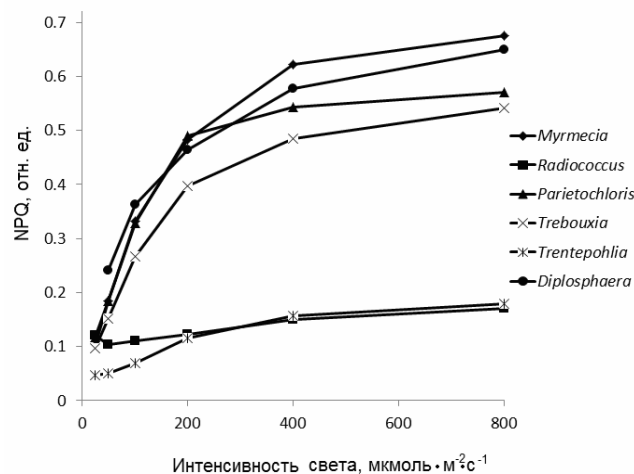


Рис. 2. Зависимость суммарного нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла (NPQ) от интенсивности света

Наивысшим уровнем фотоингибирования (qI) характеризовался штамм *Diplosphaera chodatii* — $0,33$. Менее уязвимыми к повреждающему действию света оказались *Trebouxia australis* — $0,14$, *Trentepohlia* sp. и *Myrmecia bisecta* — $0,1$. Наименьший показатель qI был у штаммов *Radiococcus signiensis* и *Parietochloris ovoideus* — $0,04$.

Изученные нами водоросли показали значительную различную чувствительность к свету, уязвимость к повреждающему действию света, а также различный вклад защитного механизма тепловой диссипации световой энергии в фотосистеме II. Наиболее приспособленными к дневному свету ($200\text{--}400 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) оказались штаммы *M. bisecta* и *P. ovoideus*. Вместе с тем, уровень фотоингибирования на высоком свету

у *M. bisecta* значительно выше, чем у *P. ovoideus*. В отличие от *M. bisecta*, у штамма *P. ovoideus* световое насыщение наступает при более низких интенсивностях света — от 400 мкмоль·м⁻²·с⁻¹, что свидетельствует о лимитировании фотосинтеза на стадии темновых реакций, вероятно, из-за меньшей доступности СО₂ у этого штамма в условиях эксперимента. У *M. bisecta* отсутствует выраженный световой оптимум. Повышение скорости электронного транспорта при высоких интенсивностях света, которое сопровождается значительным фотоингибированием, свидетельствует об активации переноса электронов на кислород. Продуцируемые при этом активные формы кислорода являются причиной фотоповреждения. При этом фотосинтетический аппарат обоих водорослей приспособлен к максимальному диапазону освещения, вероятно, за счет наибольшего размера светособирающего комплекса фотосистемы II, о чем свидетельствуют максимальные величины нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла у этих двух штаммов.

Diplosphaera chodatii, подобно *M. bisecta*, характеризовалась высокими уровнями электронного транспорта, нефотохимического тушения флуоресценции и фотоингибирования, а также повышением скорости переноса электронов при интенсивностях света выше 400 мкмоль·м⁻²·с⁻¹. Самый высокий коэффициент фотоингибирования у этого штамма также свидетельствует об активации переноса электронов на кислород и окислительном повреждении фотосинтетического аппарата.

Способность к нефотохимическому тушению световой энергии у штаммов *Trentepohlia* sp. и *Radiococcus signiensis*, вероятно, редуцирована, что наряду с их низким порогом светового насыщения может свидетельствовать о существенной роли других защитных механизмов, например на клеточном уровне. Вместе с тем, фотоингибирование у *Trentepohlia* sp. составляет больше 0,1. Следовательно, длительное освещение для данной водоросли является губительным и крайне нежелательным. Темновые реакции ассимиляции СО₂ у этой водоросли протекают крайне медленно и в условиях освещения фотосинтетическая электрон-транспортная цепь пребывает в восстановленном состоянии, что увеличивает вероятность образования свободных радикалов и окислительного повреждения клеток. *Diplosphaera chodatii* характеризовалась высокими уровнями *J*, *NPQ* и *qI*, причём *qI* составлял 0,33, что может свидетельствовать об обратимом характере фотоингибирования. Регуляция чувствительности к свету осуществляется на уровне цикла повреждения—восстановления фотосистемы II.

Таким образом, по функциональным показателям фотосинтетического аппарата исследованные штаммы можно условно разделить на 2 группы: уязвимые по отношению к свету (*Trentepohlia* sp., *Radiococcus signiensis* и *Trebouxia australis*) и светолюбивые (*Myrmecia bisecta*, *Parietochloris ovoideus* и *Diplosphaera chodatii*). При этом *Trebouxia* и *Diplosphaera* отличаются высокой скоростью фотоповреждения даже при оптимальной интенсивности света. В связи с этим предложенные ранее

условия освещения для культивирования фотобионтов (Friedl, Büdel, 2008) требуют дальнейшего пересмотра.

Заключение

При расчете оптимальной интенсивности света для культивирования исследованных нами штаммов водорослей при относительной влажности воздуха 45 % необходимо учитывать все факторы. Так, для *Trentepohlia* характерен относительно высокий коэффициент фотоингибирования, поэтому оптимальная интенсивность света для культивирования его штаммов меньше $100 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Штаммы *Radiosoccus* более устойчивы к фотоингибированию и могут расти при $\leq 200 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

Штаммы *Trebouxia* имеют повышенную чувствительность к свету и уязвимость к его повреждающему действию, поэтому рекомендуемая интенсивность света для них должна быть менее $100 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Максимальная интенсивность света для роста *Parietochloris* составляет $400 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. При этом регистрируются максимальная скорость электронного транспорта, максимальный уровень нефотохимического тушения и низкий уровень фотоингибирования. Учитывая высокий уровень фотоповреждения *Diplosphaera* и *Myrmecia* при высокой интенсивности света, несмотря на высокие скорости электронного транспорта, для роста этих двух штаммов можно рекомендовать интенсивность света менее $200 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Войцехович А.А. Фотобионты лишайников: происхождение, разнообразие и взаимоотношения с микобионтом. – Saarbrücken: Lambert Acad. Publ., 2013. – 102 с.
- Войцехович А.А., Кашевараев Г.П. Пигменты фотосинтетического аппарата зелёных водорослей-фотобионтов лишайников // Альгология. – 2010. – 20(3). – С. 287–299.
- Войцехович А.А., Михайлюк Т.И., Дариенко Т.М. Фотобионты лишайников. 1: разнообразие, экологические особенности, взаимоотношения и пути совместной эволюции с микобионтом // Там же. – 2011. – 21(1). – С. 3–26.
- Ahmadjian V. The Lichen Symbiosis. – New York: John Wiley & Sons, Inc., 1993. – 250 p.
- Algae of Ukraine: Diversity, Nomenclature, Taxonomy, Ecology and Geography. Vol. 3. *Chlorophyta* / Eds. P. Tsarenko, S.P. Wasser, E. Nevo. – Ruggell: K.-G., A.R.A. Gantner Verlag, 2011. – 511 p.
- Beck A. Selektivität der Symbionten schwermetalltoleranter Flechten. – München: Fischer GmbH, 2002. – 196 S.
- Brestic M, Zivcak M. PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in plants: protocols and applications // Molecular stress physiology of plants // Eds. G.R. Rout, A.B. Das. – Dordrecht: Springer, 2013. – P. 87–131.
- Demmig-Adams B., Adams W.W. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis // Trends Plant Sci. – 1996. – 1. – P. 21–26.
- Ettl H., Gärtner G. Syllabus der Boden-, Luft-, und Flechtenalgen. – Stuttgart, etc.: Gustav Fischer Verlag, 1995. – 710 S.

- Fernández-Marín B., Balaguer L., Esteban R. et al. Dark induction of the photoprotective xanthophyll cycle in response to dehydration // J. Plant Physiol. – 2009. – **166**. – P. 1734–1744.
- Fernández-Marín B., Becerril J.M., García-Plazaola J.I. Unravelling the roles of desiccation-induced xanthophyll cycle activity in darkness: a case study in *Lobaria pulmonaria* // Planta. – 2010. – **231**. – P. 1335–1342.
- Friedl T., Büdel B. Photobionts // The Lichen Symbiosis. – Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2008. – P. 9–26.
- Kappen L., Lange O.L. The cold resistance of phycobionts from macrolichens of various habitats // Lichenologist. – 1970. – **4**. – P. 289–293.
- Karsten U., Holzinger A. Light, temperature and desiccation effects on photosynthetic activity, and drought-induced ultrastructural changes in the green alga *Klebsormidium* sp. (*Streptophyta*) from a high alpine soil crust // Microb. Ecol. – 2012. – **63**. – P. 51–63.
- Krause G.H., Jahns P. Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching: Characterization and function // Chlorophyll *a* fluorescence: A signature of photosynthesis. – Dordrecht: Springer, 2004. – P. 464–495.
- Manrique E., Balaguer L., Barnes J., Davison A.W. Photoinhibition studies in lichens using chlorophyll // Bryologist. – 1989. – **164**. – P. 161–195.
- Tschermak-Woess E. Developmental studies in trebouxoid algae and taxonomical consequences // Plant Syst. and Evol. – 1989. – **164**. – P. 161–195.
- Voytsekhovich A., Dymytrova L., Nadyeina O. Photobiont composition of some taxa of the genera *Micarea* and *Placynthiella* (Lecanoromycetes, lichenized Ascomycota) from Ukraine // Folia Cryptog. Estonica. – 2011. – **48**. – P. 135–148.

Поступила 22 мая 2013 г.

Подписала в печать Е.И. Шнюкова

A.V. Polishchuk, A.A. Voytsekhovich

N.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine,
2, Tereshchenkovskaya St., 01001 Kiev, Ukraine

PHOTOSYNTHETIC PROPERTIES OF SOME FREE-LIVING AND LICHENIZED GREEN TERRESTRIAL ALGAE

The photosynthetic properties of 4 strains of free-living green terrestrial algae (*Diplosphaera chodatii*, *Parietochloris ovoideus*, *Myrmecia bisecta* and *Trentepohlia* sp.) and 2 strains of green photobionts of lichens (*Radiococcus signiensis* and *Trebouxia australis*) were studied. As a result of our work the optimum light intensity for cultivating algae strains at a relative humidity of 45 % was found: for *Trentepohlia* it is $\leq 100 \mu\text{E} / (\text{m}^2 \cdot \text{s})$, *Radiococcus* and *Trebouxia* $\leq 200 \mu\text{E} / (\text{m}^2 \cdot \text{s})$, *Parietochloris* $\leq 400 \mu\text{E} / (\text{m}^2 \cdot \text{s})$, *Diplosphaera* and *Myrmecia* $\leq 800 \mu\text{E} / (\text{m}^2 \cdot \text{s})$. Besides, it was revealed that *Trentepohlia* sp., *Radiococcus signiensis* and *Trebouxia australis* are vulnerable to light, while *M. bisecta*, *P. ovoideus* and *D. chodatii* are well adapted to intensive illumination. However, the strains *T. australis* and *D. chodatii* in their groups stand high speed photochemical damage even under optimal light intensity.

Key words: photosynthesis, *NPQ*, *qI*, light intensity, lichen photobionts, *Trebouxia*, *Trentepohlia*, *Myrmecia*, *Diplosphaera*, *Radiococcus*, *Parietochloris*, green algae, adaptation.