

## **ФОТОИНГИБИРОВАНИЕ И ИЗМЕНЕНИЯ В ПИГМЕНТНОМ СОСТАВЕ ПОБЕГОВ EPHEDRA MONOSPERMA ПРИ ФОРМИРОВАНИИ МОРОЗОУСТОЙЧИВОГО СОСТОЯНИЯ В УСЛОВИЯХ ЭКСТРЕМАЛЬНОГО КЛИМАТА ЯКУТИИ**

**Софронова В.Е., Чепалов В.А.**

*Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, Якутск, Россия, e-mail: vse07\_53@mail.ru*

Формирование морозоустойчивого состояния вечнозеленых растений *Ephedra monosperma* Gmelin ex C.A. Meyer в условиях экстремального климата Якутии сопровождается фотоингибированием фотосистемы 2 и выраженными изменениями в пигментном составе ассимилирующих побегов. Этот период охватывает вхождение растений в состояние покоя, первую и вторую фазу закаливания. Снижение содержания хлорофилла на 35–40% уменьшает эффективность абсорбции света фотосинтетическим аппаратом (ФСА) на единицу площади и способствует обеспечению фотостаза в период закаливания. Несмотря на постоянство содержания суммы каротиноидов, происходят выраженные изменения в их качественном составе. Достоверно снижается доля ( $\alpha+\beta$ )-каротинов, повышается содержание ксантофиллов в пуле желтых пигментов. Обнаружен альтернативный путь превращения зеаксантина (Zea) – его окисление с образованием фотозащитного вторичного ретрокетокаротиноида родоксантина (Rhd, 4', 5'-didehydro-4,5'-retro- $\beta,\beta$ -carotene-3,3'-dione). Индукция его синтеза происходит на ранней стадии фотоингибирования фотосистемы 2. Накопление вторичного каротиноида Rhd, не участвующего в процессах переноса энергии в фотосинтетическом аппарате, способствует повышению устойчивости растения к фотоингибированию.

Ключевые слова: флуоресценция хлорофилла, родоксантин, фотоадаптация, криолитозона.

## **PHOTOINHIBITION AND CHANGES IN THE PIGMENT COMPOSITION OF EPHEDRA MONOSPERMA SHOOTS DURING FORMATION OF FROST HARDINESS UNDER THE EXTREME CLIMATE OF YAKUTIA**

**Sofronova V.E., Chepalov V.A.**

*Institute for Biological Problems of Cryolithozone SB RAS (IBPC), Yakutsk, Russia, e-mail: vse07\_53@mail.ru*

The frost hardiness in evergreen plants of *Ephedra monosperma* Gmelin ex C.A. Meyer under the conditions of the extreme climate of Yakutia is followed by photoinhibition of the photosystem II (PS II) and pronounced changes in the pigment composition of assimilating shoots. This period includes the entry of plants into a dormant state, first and second phases of hardening. A 35-40% reduction of the chlorophylls (a+b) content decreases the efficiency of light absorption by a photosynthetic apparatus (PSA) per a unit of area and provides for photostasis during the period of hardening. Despite a content stability of the carotenoids sum there are pronounced changes in their qualitative composition. The ( $\alpha+\beta$ )-carotenenes level becomes definitely lower and xanthophylls content increases in the pool of yellow pigments. An alternative pathway of zeaxanthin transformation, i.e. its oxidation, mediates synthesis of photoprotective secondary retroketocarotenoid rhodoxanthin (Rhd, 4', 5'-didehydro-4,5'-retro- $\beta,\beta$ -carotene-3,3'-dione). Induction of its synthesis occurs on the earlier stage of photoinhibition of photosystem II. Accumulation of the secondary carotenoid (Rhd) that does not participate in the processes of energy transfer within the photosynthetic apparatus, favors plant resistance to photoinhibition.

Key words: chlorophyll fluorescence, rhodoxanthin, photoadaptation, permafrost zone.

В неблагоприятных условиях избыток световой энергии, которая не может быть использована в фотохимических реакциях, повышает вероятность фотодеструкции фотосинтетического аппарата (ФСА). Поэтому молекулярные механизмы, снижающие количество света, достигающего реакционных центров (РЦ) ФСА, играют важную роль в

адаптации растений к абиотическим стрессирующим факторам среды. Одним из общих защитных механизмов от избыточного света является накопление фотозащитных пигментов, которые выполняют функцию световых фильтров в определенной спектральной области [1].

В побегах вечнозеленых растений *Ephedra monosperma* Gmelin ex C.A. Meyer из семейства *Ephedraceae* обнаружен альтернативный путь превращения зеаксантина (Zea) – его окисление с образованием фотозащитного вторичного ретрокетокаротиноида родоксантина (Rhd, 4', 5'-didehydro-4,5'-retro- $\beta,\beta$ -carotene-3,3'-dione) [2]. Ареал *E. monosperma* занимает наиболее континентальные области азиатского материка, включая Тибет и Монголию. В Якутии произрастает в южных, центральных и восточных районах [3]. Светолюбивое и засухоустойчивое растение, обладает всеми признаками крайней ксероморфности. На отдельных остепненных участках в составе сообществ является доминирующим видом, а также встречается в мертвопокровных толокнянковых сосняках. Особенностью видов эфедры является отсутствие зеленых листьев. Функцию ассимиляции несут побеги.

**Целью** настоящей работы является выявление динамики изменения фотохимической эффективности ФС II (фотосистемы II) и пигментного состава побегов *E. monosperma* при формировании морозоустойчивого состояния в условиях экстремального климата Якутии. Актуальность работы связана с проблемой устойчивости вечнозеленых растений в условиях криолитозоны.

Исследования проводили в 2008–2010 гг. в питомнике Якутского ботанического сада Института биологических проблем криолитозоны СО РАН, расположенного на второй надпойменной террасе долины р. Лены в 7 км к западу от г. Якутска (62°15' с.ш., 129°37' в.д.). Почвы участка слабозасоленные мерзлотно-лугово-черноземные супесчаные. Средняя температура воздуха за май–сентябрь 2009 г. составляла 14.2 °С, сумма осадков 142 мм (среднегодовое значение – 161 мм) соответственно. Вегетационный период 2010 г. характеризовался средней температурой воздуха 13.5 °С и суммой осадков 146 мм. Таким образом, исследуемые годы имели схожие погодные характеристики во время роста и развития растений при минимальных зимних температурах воздуха -46–48 °С. В опытах использовали ассимилирующие побеги IV–V порядка и побеги первого года (VI порядок) зрелых генеративных растений. Отбор проб на пигменты осуществляли через 7–10 дней. Количественное определение хлорофиллов *a* и *b* (Хл *a* и *b*) проводили в 80%-ном ацетоновом экстракте [4; 5]. Качественный и количественный состав каротиноидов (Кар) анализировали методом ТСХ в нашей модификации [4; 5; 6]. Удельный коэффициент экстинкции  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  для Rhd 2500 при 507 нм [1]. Каждый опыт состоял из трех параллельных биологических повторностей. Максимальный квантовый выход ФС II (или максимальную фотохимическую эффективность ФС II) как отношение переменной флуоресценции к максимальной:  $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$  определяли с помощью импульсного флуориметра Mini-PAM (Walz, Effeltrich, Germany) у 8–16 независимых биологических образцов [7]. Степень фотоингибирования определяли как снижение максимального квантового выхода в процентах по отношению к летнему максимальному значению  $F_v/F_m$ , определенному 10 августа 2010 г. Температуру воздуха на опытном участке регистрировали с помощью термографов DS 1922L iBitton («Dallas Semiconductor», США). В таблицах и графиках приведены средние арифметические значения и их стандартные отклонения. При определении долевого содержания индивидуальных Кар от суммы Кар относительная ошибка составила 5–6%. Все данные обрабатывались в среде электронной таблицы Microsoft Excel 2002 из пакета Microsoft Office с использованием макроса-дополнения XLSTAT-Pro. Статистическая проверка данных велась в пакете StatSoft Statistica 6.0.

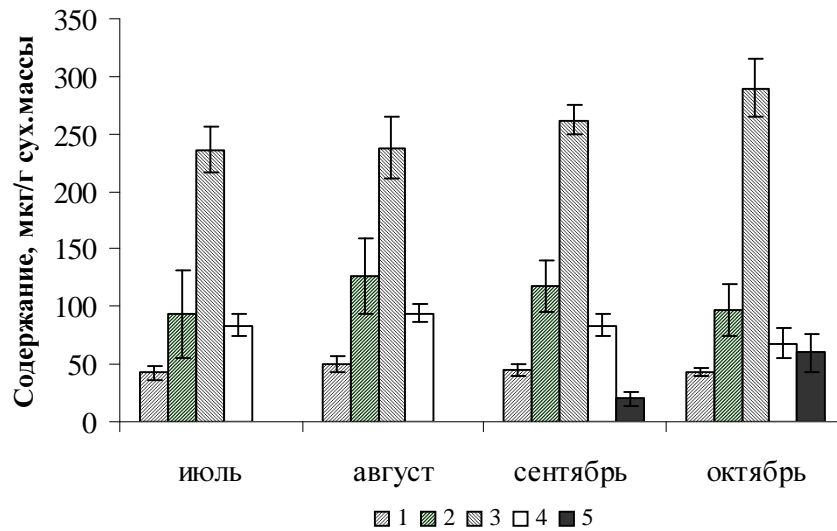
Изучение содержания Хл и Кар в побегах *E. monosperma* показало, что их максимум наблюдается к окончанию ростовых процессов – в августе (табл. 1). В это же время отмечается минимальное содержание Лют+Зea (лютеина и зеаксантина) –  $0.24 \pm$

0.02 мг/Г<sub>сух. массы</sub> ( $51.8 \pm 4.3\%$  от суммы Кар без учета Rhd), максимальный уровень ( $\alpha+\beta$ )-Кар (каротинов) –  $0.09 \pm 0.01$  мг/Г<sub>сух. массы</sub> ( $18.5 \pm 2.0\%$ ) за вегетационный сезон (рис. 1). Со второй половины августа до конца октября происходили выраженные изменения в пигментном составе (табл. 1; рис. 1), включая период вхождения в органический покой, первую и вторую фазы закаливания [8]. По наблюдениям 2009 и 2010 гг., при формировании морозоустойчивого состояния содержание Хл ( $a + b$ ) в побегах уменьшается на 35–40%, а отношение Хл/Кар снижается почти в два раза по сравнению с летними значениями. К концу октября достоверно также снижается доля ( $\alpha+\beta$ )-Кар до  $13.6 \pm 2.5\%$  в сумме фотосинтетических Кар. При этом содержание Нео (неоксантина) остается практически постоянным. В летние месяцы в активно ассимилирующих побегах Rhd отсутствует (рис. 1). Его появление отмечается в начале сентября и по времени совпадает с началом снижения Хл и ( $\alpha+\beta$ )-Кар, некоторым увеличением доли ксантофиллов (Ксан) в пуле желтых пигментов. Количество Rhd в верхних ассимилирующих побегах увеличивалось. Однако в нижних затененных частях побегов *E. monosperma* он отсутствовал. В течение первой фазы закаливания низкими положительными температурами (рис. 2) содержание Rhd нарастало от следовых до  $19.6$  мкг/Г<sub>сух. массы</sub> ( $3.8 \pm 1.2\%$  от суммы Кар). Его максимальная концентрация ( $59.9 \pm 16.3$  мкг/Г<sub>сух. массы</sub> или  $10.8 \pm 2.9\%$  от суммы Кар) достигалась в начале второй фазы закаливания после 3–5 дней при установлении устойчивых отрицательных температур.

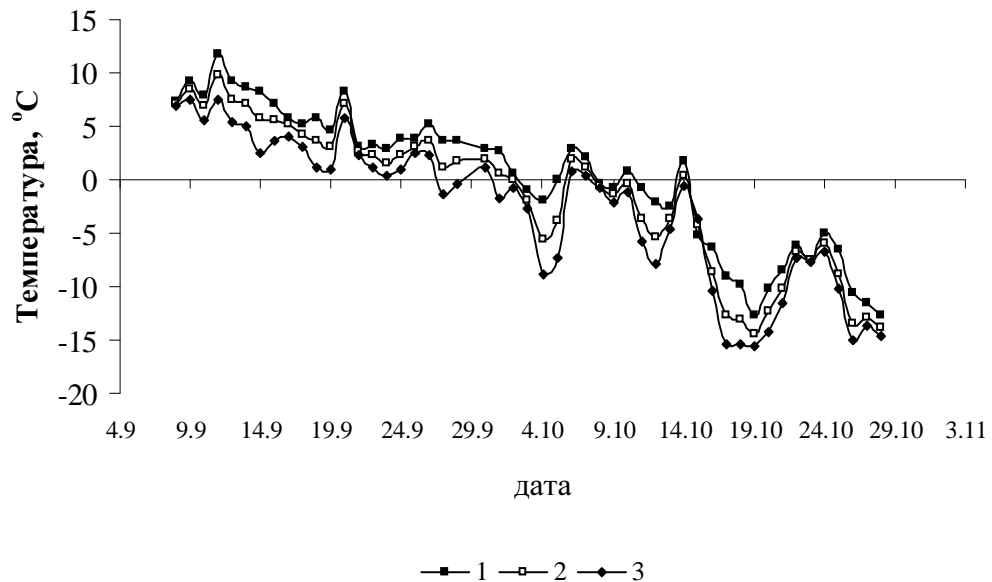
**Таблица 1 – Содержание и соотношение пигментов (мг/Г<sub>сух. массы</sub>) в побегах *E. monosperma***

Срок взятия проб	Этапы развития растения	Хл ( $a + b$ )	Хл $a$ /Хл $b$	Сумма Кар*	Хл/Кар
конец июня-июль	развитие и созревание семян, прекращение роста побегов в конце июля	$2.87 \pm 0.27$	3.6	$0.46 \pm 0.05$	6.2
август	процесс покрытия пробкой побегов, заложение почек	$2.83 \pm 0.40$	3.5	$0.51 \pm 0.06$	5.6
сентябрь	увеличение массы почек, 1 фаза закаливания	$2.49 \pm 0.32$	3.5	$0.53 \pm 0.04$	4.7
октябрь	2 фаза закаливания	$1.92 \pm 0.21$	3.5	$0.56 \pm 0.05$	3.4

\* – сумму Кар вычисляли с учетом содержания Rhd. Приведены усредненные данные за 2009 и 2010 гг.



**Рис. 1. Динамика каротиноидного состава в побегах *E. monosperma* (2009–2010 гг.):** 1 – Нео; 2 – Вио + Зеа; 3 – Лют+Зеа; 4 – (α+β)-Кар; 5 – Rhd.



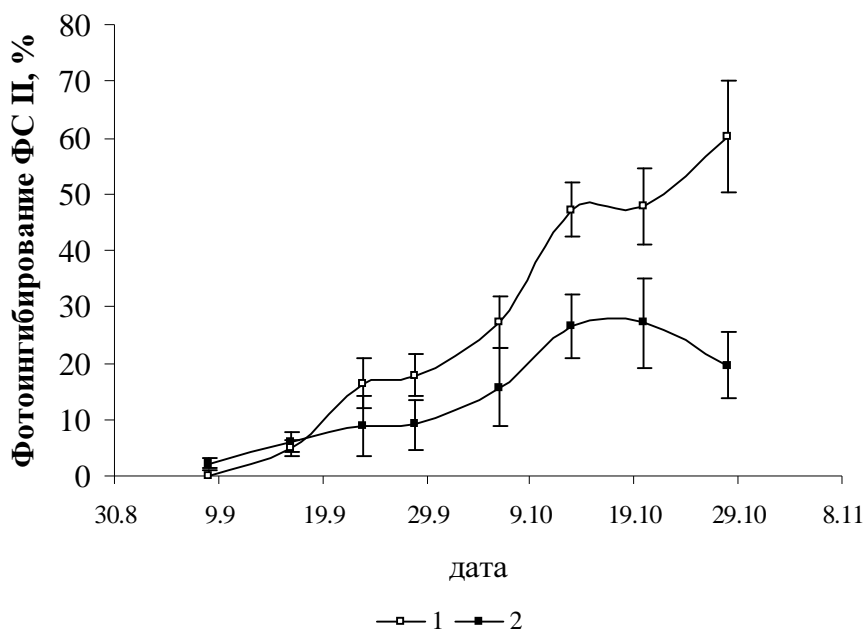
**Рис. 2. Температура воздуха осенью 2010 г.:** 1 – средняя температура за светлое время суток; 2, 3 – среднесуточная и ночная температура соответственно.

К концу сентября после прохождения недельного закаливания низкими положительными температурами (рис. 2) необратимое и обратимое фотоингибирование составило 17.9 и 9.1% по отношению к летнему максимальному значению  $F_v/F_m$  (рис.3). За этот период температуры были равны  $3.6 \pm 1.2$ ,  $2.3 \pm 0.8$ ,  $1.0 \pm 1.3$  °C в светлое время суток, за сутки, в ночное время соответственно. К началу достижения максимума содержания Rhd (к 6 октября) при наступлении слабых морозов (-3.8–5.6 °C 3–5 октября) необратимое фотоингибирование возрастало до 27.2%, обратимое до 15.7%, несмотря на кратковременное потепление до низких положительных температур 6 октября. В дальнейшем к середине октября обратимое фотоингибирование при снижении ночных температур до -5–8 °C достигало максимальных значений 26.6–27.1% (рис. 3), которое происходило в результате тушения параметров  $F_o$  и  $F_m$  (фоновой и максимальной флуоресценции Хл) с участием пигментов виолаксантинового цикла (ВЦ). В дальнейшем его глубина практически оставалась постоянной и не зависела от дальнейшего снижения

температур до  $-40$ – $-45$  °С в зимние месяцы. При  $-12.4$ – $-15.6$  °С величина необратимого фотоингибирования составила 47.8–52.7%.

Снижение фотосинтеза в конце августа и начале сентября при вхождении в покой растения приводит к нарушению баланса между световой энергией, адсорбируемой реакционными центрами фотосистем, и энергией, потребляемой в темновых реакциях фотосинтеза. Снижение общего количества Хл ( $a+b$ ) начинается задолго до заморозков на самой ранней стадии фотоингибирования ФС II и направлено на уменьшение эффективности абсорбции света ФСА на единицу площади [9]. Это способствует обеспечению фотостаза в первую фазу закаливания, а также, по-видимому, регуляции фотофизических процессов во вторую фазу закаливания при углублении степени необратимого фотоингибирования. Несмотря на снижение Хл, «избыточный» свет при неуклонном снижении температуры приводит к образованию АФК (активных форм кислорода), которые могут быть вторичными мессенджерами в образовании Rhd из Вио при его окислении [10].

Нами установлено, что клетки с красным пигментом в побеге располагаются в 2–3 ряда в паренхиме под эпидермой, с солнечной стороны, убывая и исчезая в теневой части среза побега [2]. При невысоком содержании Хл ( $1.4$ – $2.5$  мг/г<sub>сух. массы</sub> в период присутствия Rhd) он эффективно поглощает значительную часть фотоактивной радиации в зеленой области спектра и может образовывать эффективные ловушки излучения в широкой полосе 450–600 нм [1]. Солнечное излучение наиболее глубоко проникает в ассимилирующие ткани растений в этой области. Формирование «фотозащитного экрана» и поддержание его функционирования в неблагоприятные периоды требует минимальных затрат энергии, что позволяет обеспечить длительную фотоадаптацию реликтового растения. В отличие от ферментативных систем, функционирование «пассивного родоксантинового экрана» не зависит от понижения или колебаний температуры и может работать также эффективно в зимние месяцы, что крайне важно для вечнозеленого растения.



**Рис. 3.** Динамика фотоингибирования ФС II в побегах *E. monosperma* (2010 г.): 1, 2 – необратимое, обратимое фотоингибирование. Планки погрешностей представляют  $\pm$  стандартные отклонения ( $n = 16$ ).

В отличие от вечнозеленых хвойных деревьев, рост фракции – Лют + Зеа – при прохождении закаливания слабо выражен. По-видимому, ее небольшое увеличение (рис. 2) происходит в основном за счет ингибирования обратной реакции ВЦ [11].

Судя по динамике обратимого фотоингибирования, Зеа начинает присутствовать круглосуточно при снижении средних ночных температур до +1.0–3.0 °С. Подъем уровня пигментов ВЦ наблюдается также во вторую фазу закаливания, что позволяет поддерживать нефотохимическое тушение избыточной световой энергии растением на достаточном уровне независимо от рН люмена при отсутствии электронного транспорта. В отличие от *P. sylvestris* усиление образования Лют в побегах растений *E. monosperma* во время закаливания не отмечается. По-видимому, Ксан усиливают различные способы нефотохимического тушения Хл [12] в оставшихся активных и дезактивированных комплексах ФС II и ФС I, в то время как образование Rhd происходит в результате трансформации хлоропластов в нефотосинтезирующие хромопласты [10].

*Статья подготовлена в рамках проведения VI Съезда Российского фотобиологического общества в рамках госконтракта № 14.741.12.0157 Министерства образования и науки Российской Федерации.*

## Список литературы

1. Merzlyak M., Solovchenko A., Pogosyan S. Optical properties of rhodoxanthin accumulated in *Aloe arborescens* Mill. leaves under high-light stress with special reference to its photoprotective function. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2005. – V. 4. – P. 333–340.
2. Софронова В.Е., Семенова В.В. Фотоадаптация *Ephedra monosperma* к холодному климату Центральной Якутии // Перспективы фитобиотехнологии для улучшения качества жизни на Севере : материалы междунар. конф. – Якутск : Издательско-полиграфический комплекс СВФУ, 2010. – С. 112–116.
3. Атлас лекарственных растений Якутии / сост. Л.В. Кузнецова, В.И. Захарова, А.А. Егорова и др.; отв. ред. Б.И. Иванов. – Якутск : ЯФ Изд-ва СО РАН, 2003. – Т. 1: Лекарственные растения, используемые в научной медицине. – 194 с.
4. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and Carotenoids Pigments of Photosynthetic Biomembranes // *Methods Enzymol.* 1987. – V. 148. – P. 350–382.
5. Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В. Большой практикум по фотосинтезу. – М. : Академия, 2003. – 256 с.
6. Петров К.А. [и др.]. Сезонные изменения содержания фотосинтетических пигментов у многолетних травянистых растений криолитозоны // *Физиология растений.* – 2010. – Т. 57. – № 2. – С. 192–199.
7. Корнеев Д.Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла. – Киев : Альтерпрес, 2002. – 188 с.
8. Туманов И.И. Физиология закаливания и морозостойкости растений. – М. : Наука, 1979. – 350 с.
9. Oquist G., Huner N.P.A. Photosynthesis of Overwintering evergreen Plants // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2003. – V. 54. – P. 329–355.
10. Bouvier F., Backhaus R.A., Camara B. Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273. – P. 30651–30659.
11. Adams W.W., Demmig-Adams B. Carotenoid Composition and Down Regulation of Photosystem II in three Conifer Species during Winter // *Physiol. Plant.* – 1994. – V. 92. – P. 451–458.

12. Horton P., Wentworth M., Ruban A. Control of the Light harvesting Function of Chloroplast Membranes: The LHCII-Aggregation Model for Non-Photochemical Quenching // FEBS Letters. – 2005. – V. 579. – P. 4201–4206.

**Рецензенты:**

Данилова Н.С., д.б.н., профессор, зам. директора Ботанического сада Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Амосова МоИН РФ, г. Якутск.

Миронова Г.Е., д.б.н., профессор кафедры высокомолекулярных соединений, органической и биологической химии биолого-географического факультета Северо-Восточного федерального университета, г. Якутск.

Работа получена 23.11.2011