

ORIGINAL ARTICLE

CAROTENOID INVOLVEMENT IN THE REGULATION OF *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid RESISTANCE TO COLD SHOCK

Sofronova V.E., Chepalov V.A., Petrov K.A.

Plant Physiology Group, Institute for Biological Problems of Cryolithozone SD RAS,
677980 Yakutsk, Russia

e-mail: v_e_sofronova@ibpc.ysn.ru

Received November 21, 2005

Abstract - Effect of short-time (15 sec, 5, 15, 30 min) cold stress (0,1-0,2°C) at 0,1 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ over the *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid carotenoid composition cultivated under the laboratory conditions has been studied. It is found that the sum of carotenoid pigments of *Spirodela polyrhiza* (L.) does not change and averages $206,9 \pm 11,5$ mkg/g in fresh weight. Pool increase of lutein+zeaxanthin (by 5-8%) has been observed in response to a short-time *Spirodela polyrhiza* cooling with simultaneous decrease of violaxanthin content (by 16%). Violaxanthin de-epoxidation occurs in the minute time spans and the depth of conversion does not depend on the cold shock duration. The data obtained indicate that pigments of the violaxanthin cycle may participate in realization of transitory emergency protection systems of photosynthetic apparatus by increasing the share of thermal energy dissipation of the absorbed light and preventing singlet oxygen formation.

Key words: Cold shock, violaxanthin cycle, thermogenesis

ORIGINAL ARTICLE

РОЛЬ КАРОТИНОИДОВ В РЕГУЛЯЦИИ УСТОЙЧИВОСТИ *SPIRODELA POLYRHIZA* (L.) SCHLEID К ХОЛОДОВОМУ ШОКУ

Софронова В.Е., Чепалов В.А., Петров К.А.

Институт биологических проблем Севера СО РАН, 677980 Якутск, Россия.

e-mail: v_e_sofronova@ibpc.ysn.ru

Поступила в редакцию 21 Ноября 2005

Изучено влияние кратковременного (15 сек., 5, 15, 30 мин) холодового шока (0,1-0,2 °C) при освещении ФАР 0,1 мМ/ м² с⁻¹ на состав каротиноидов *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid, культивируемого в лабораторных условиях. Выявлено, что сумма каротиноидных пигментов многокоренника при холодовом шоке не изменяется и в среднем составляет 206,9 ± 11,5 мкг/г сырого веса. В ответ на кратковременное охлаждение многокоренника установлено увеличение пула лютеин + зеаксантин (на 5-8%) с одновременным уменьшением содержания виолаксантина (на 16 %). Дезоксидация виолаксантина происходит в минутных временных диапазонах и глубина превращения не зависит от продолжительности холодового шока. Полученные результаты указывают на то, что пигменты виолаксантинового цикла могут участвовать в реализации транзиторных аварийных систем защиты ФСА путем увеличения доли тепловой диссипации энергии поглощенных квантов света и предотвращения образования синглетного кислорода.

Key words: холодовой шок/ виолаксантиновый цикл/ термогенез

В последние годы развиваются представления, придающие важную роль каротиноидам как антиоксидантам (Miller и др., 1996) и фотопротекторам, влияющим на процессы переноса электронов в ЭТЦ (электронотранспортной цепи) и генерации АФК (активных форм кислорода) в хлоропластах (Бухов, 2004). Каротиноиды, содержащиеся в РЦ (реакционном центре) ФС2, а также входящие в состав ССК (светособирающего комплекса) ФС2 могут обезвреживать хлорофилл в триплетном состоянии, который мог бы образовывать высокореактивный окислитель – синглетный кислород ¹O₂ (Siefermann-Harms, 1987). Имеются данные, что β-каротин, связанный с РЦ защищает белок D1 кислородвыделяющего центра ФС2 от синглетного кислорода (Tefler и др., 1994). Возможно также прямое тушение возбужденного состояния синглетного хлорофилла а, сопровождающееся тепловой диссипацией (Horton и др., 1996). В этот процесс вовлечены пигменты ВЦ (виолаксантинового цикла) (Demmig-Adams, 1990).

Целью настоящей работы была проверка предположения об участии каротиноидных пигментов в формировании стресс-реакции *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid в ответ на кратковременный холодовой шок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект и условия выращивания. В работе использовали культивируемые длительное время в лабораторных условиях растения многокоренника обыкновенного. Для этого они выращивались в питательной среде Гельригеля с половинной дозой солей, при pH 6,1-6,3, круглосуточном освещении ФАР 0,1 мМ/ м² с⁻¹, температуре и относительной влажности воздуха – 27-30°C и 95-100% соответственно.

Проведение опытов по холодовому шоку. Холодовой шок создавали, помещая интактные растения многокоренника обыкновенного в охлажденную до 0,1 – 0,2 °C питательную среду Гельригеля с четвертичной дозой солей, на 15 сек, 5, 15, 20 мин и освещении ФАР 0,1 мМ/м² с⁻¹. Температуру поддерживали с помощью термостата MULTITEMP II 2219 (LKB, Швеция). Определение состава пигментов проводили сразу после окончания холодового действия и через 3 часа. Контролем служили растения той же партии, выдержанные при комнатной температуре.

Анализ пигментов. Навеску свежего растительного материала (50 мг) тщательно растирали в фарфоровой ступке с безводным Na₂SO₄ (около 200 мг) и 10-15 мг CaCO₃. Измельченный в порошок растительный

материал экстрагировали смесью ацетона и этилового спирта в отношении 3:1. Экстракт объемом 3-4 мл центрифугировали при 2-4 °С. Экстракцию осадка повторяли 2 раза. Прозрачные центрифугаты объединяли и концентрировали под вакуумом при комнатной температуре.

Качественный состав каротиноидов анализировали методом ТСХ. Суммарный экстракт пигментов наносили на пластинку Sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ (10 x 10 см, Россия). Для хроматографии использовали систему растворителей этанол – бензол – ацетон – петролейный эфир (0,3 : 1 : 2 : 6,7). Элюаты каротинов в хлороформе, ксантофиллов в этаноле идентифицировали по спектрам поглощения,

полученным на спектрофотометре Shimadzu UV-240 (Япония). Количественное содержание каждого из пигментов рассчитывали по основному максимуму поглощения: β-каротина при 464 нм, лютеина-446 нм, виолаксантина-442 нм, неоксантина-438 нм (Сахарова, 1969), используя удельные коэффициенты экстинкции (Lichtenthaller, Wellburn, 1983).

Определения проводили в опытах, каждый из которых состоял из 3 параллельных биологических повторностей. В таблицах приведены средние арифметические значения с их стандартными ошибками ($n = 3$).

Таблица 1. Влияние холодового шока (0,1-0,2 °С) на содержание индивидуальных каротиноидов (мкг/г сырого веса) и их соотношения (% от суммы каротиноидов) в *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid сразу после действия

Дата	Вариант опыта	β-каротин		Неоксантин		Виолаксантин		Лютеин + зеаксантин		Сумма каротиноидов
		мкг/г	%	мкг/г	%	мкг/г	%	мкг/г	%	
15.04.05	контроль	58.5 ± 2.3	26.5	37.1 ± 1,5	16.8	19.7 ± 0.8	8.9	105.4 ± 4.2	47.8	220.7 ± 8.6
	опыт 1	58.8 ± 2.4	26.9	31.1 ± 1.2	14.3	19.4 ± 0,8	8.9	108.9 ± 4.4	49.9	218.2 ± 8.5
18.10.04	контроль	61.2 ± 2.5	33.0	30.6 ± 1.2	16.5	10.0 ± 0.5	5.4	83.7 ± 3.9	45.1	185.5 ± 7.2
	опыт 2	59.0 ± 2.4	-	-	-	7.6 ± 0.5	-	90.4 ± 4.1	-	-
19.10.04	контроль	63.9 ± 2.6	31,3	34.3 ± 1.4	16.9	11.4 ± 0.5	5.6	94.4 ± 3.8	46.3	204.0 ± 7.9
	опыт 2	67.0 ± 2.4	29.6	38.1 ± 1.5	16.8	11.1 ± 0.6	4.9	111.3 ± 4.5	48.9	227.5 ± 8.9
07.04.05	контроль	56.7 ± 2.3	28.6	37.3 ± 1.5	18.8	17.1 ± 0.7	8.6	87.4 ± 3.5	44.0	198.5 ± 7.7
	опыт 2	54.8 ± 2.2	27.3	34.3 ± 1.4	17.1	14.4 ± 0.6	7.2	97.3 ± 3.9	48.4	200.8 ± 7.8
21.10.04	контроль	63.0 ± 2.6	31.8	33.6 ± 1,3	16.9	10.9 ± 0.5	5.5	90.8 ± 4.1	45.8	198.3 ± 7.9
	опыт 3	61.9 ± 2.5	28.9	39.8 ± 1.6	18.6	9.1 ± 0.4	4.3	103.1 ± 4.6	48.2	213.9 ± 7.9
20.04.05	контроль	60.8 ± 2.4	29.5	39.8 ± 1.6	19.3	19.6 ± 0.8	9.5	85.8 ± 3.4	41.7	206.0 ± 8.0
	опыт 3	61.5 ± 2.5	29.0	34.7 ± 1.4	16.4	18.3 ± 0.7	8.6	97.4 ± 3.9	46.0	211.9 ± 8.3
12.04.05	контроль	58.6 ± 2.3	27.8	42.1 ± 1.7	20.0	15.9 ± 0.6	7,5	94.0 ± 3.8	44.7	210.6 ± 8.2
	опыт 4	65.4 ± 2.6	31.4	34.2 ± 1.4	16.4	12.7 ± 0,5	6,1	95.8 ± 3.8	46.1	208.1 ± 8.1

примечание: вариант опыта: 1, 2, 3, 4– продолжительность холодового шока 15 с, 5, 15, 30 мин соответственно

РЕЗУЛЬТАТЫ

В таблице 1 представлены данные о количественном составе каротиноидных пигментов многокоренника для разных вариантов опытов. Большую долю в сумме каротиноидов составляли лютеин + зеаксантин, затем β-каротин и неоксантин, меньше всего содержалось виолаксантина. Однако для апрельских контрольных растений в целом характерно более повышенное относительное содержание виолаксантина – 8,6 %, неоксантина – 18,7 % и несколько пониженное содержание β-каротина (28,1 %) по сравнению с осенними, что является

проявлением эндогенных сезонных ритмов. В связи с этим обстоятельством, а также по причине наличия такого фактора, как суточный ход изменений долевого содержания каротиноидов, определение пигментного состава в контрольных и опытных растениях проводили в одно и то же время.

Растения после проведения холодового шока по внешним признакам не отличались от контрольных. Суммарное содержание каротиноидов при холодовом шоке практически не менялось, и оставалась в пределах коэффициента вариации для контрольных

растений ($206,9 \pm 11,5$ мкг/г сырого веса). Охлаждение многокоренника в течение 15 с, практически не влияло на пигментный состав ВЦ. Однако увеличение продолжительности холодового шока до 5, 15, 30 мин приводило к достоверному возрастанию пула лютеин + зеаксантин при одновременном снижении содержания виолаксантина во всех опытах не зависимо от сезона года. Уменьшение долевого содержания виолаксантина у подвергнутых холодовому шоку растений составляло в среднем 16 % по сравнению с контрольными растениями, тогда как пул пигментов лютеин + зеаксантин возрастал на 5-8 %. Глубина и направленность

изменений пигментного состава не зависели от продолжительности холодового шока. Во всех вариантах опытов после холодового шока количественные соотношения каротиноидов при комнатной температуре довольно быстро восстанавливались и через 3 часа были сопоставимы с показателями у контрольных растений (табл.2). Таким образом, у многокоренника в ответ на кратковременные холодовые воздействия возникают быстрые обратимые реакции с участием пигментов ВЦ..

Таблица 2. Содержание индивидуальных каротиноидов (мкг/г сырого веса) и их соотношения (% от суммы каротиноидов) в *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid через 3 часа после холодового шока ($0,1-0,2^{\circ}\text{C}$)

Дата	Вариант опыта	β -каротин		Неоксантин		Виолаксантин		Лютеин + зеаксантин		Сумма каротиноидов
		мкг/г	%	мкг/г	%	мкг/г	%	мкг/г	%	
07.04.05	контроль	56.7 ± 2.3	28.6	37.3 ± 1.5	18.8	17.1 ± 0.6	8.6	87.4 ± 3.5	44.0	$198.5 \pm 7,7$
	опыт 1	61.5 ± 2.5	30.4	37.4 ± 1.5	18.6	12.6 ± 0.5	6.3	90.0 ± 3.6	44.7	$201.5 \pm 7,9$
13.04.05	контроль	44.6 ± 1.8	22.9	37.4 ± 1.5	19.2	20.2 ± 0.8	10.4	92.5 ± 3.7	47.5	$197.7 \pm 7,7$
	опыт 2	41.3 ± 1.7	21.9	38.6 ± 1.5	20.5	19.5 ± 0.8	10.3	89.3 ± 3.5	47.3	$188.7 \pm 7,4$
13.04.05	контроль	44.6 ± 1.8	22.9	37.4 ± 1.5	19.2	20.2 ± 0.8	10.4	92.5 ± 3.7	47.5	$194.7 \pm 7,7$
	опыт 3	51.3 ± 2.1	23.0	42.1 ± 1.7	18.9	25.8 ± 1.0	11.6	103.9 ± 4.2	46.6	$223.1 \pm 8,7$

примечание: вариант опыта: 1, 2, 3, – продолжительность холодового шока 5, 15, 30 мин соответственно

ОБСУЖДЕНИЕ

Мы предполагаем, что увеличение пула лютеин + зеаксантин в минутных временных интервалах происходит за счет образования дополнительных количеств зеаксантина из виолаксантина путем дезпоксидации. Изменения в содержании пигментов ВЦ в указанных временных интервалах могут наблюдаться в результате взаимных переходов - реакций дезпоксидации и эпоксидации, и обусловлены изменениями pH в мембране тилакоидов (Demmig-Adams и др., 1996). Таким образом, наблюдаемое увеличение пула лютеин + зеаксантин путем синтеза дополнительных количеств пигментов исключается. Это подтверждается также нашими данными, так как сумма каротиноидов многокоренника в ходе опытов остается практически постоянной (табл.1).

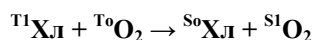
На наш взгляд последовательность событий можно представить следующим образом. В ответ на резкое снижение температуры возникает

дисбаланс между фотофизическими (которые практически не зависят от температуры) с одной стороны, и температурозависимыми процессами переноса электронов, фотофосфорилирования в хлоропластах. При этом свет становится «избыточным», не изменяясь по абсолютной интенсивности. Каждый поглощенный квант может либо индуцировать электронный транспорт в ФСА, либо диссипировать в тепло, либо высветиться в виде кванта флуоресценции (Бухов, 2004). По-видимому, при пониженных температурах необходимость в увеличении доли тепловой диссипации возрастает.

При низких температурах фотофосфорилирование ADP и транспорт протонов в строму через тилакоидную мембрану замедляется, что ведет в закислению люмена. Существенную активность при пониженных температурах проявляет также хлоропластная АТРазная помпа, которая осуществляет обратный транспорт протонов из стромы в люмен (Demmig-Adams и др., 1996). Тем не менее, для поддержания минимально необходимого уровня

протонного градиента в тилакоидных мембранах существенный вклад вносят альтернативные пути ЭТЦ хлоропластов (Neubauer, Yamamoto 1992; Heber, Walker, 1994 и др.).

Избыток ионов водорода в люмене, по-видимому, активирует VDE (деэпоксидазу виолаксантина), характерным свойством которой является оптимум активности при пониженных рН. Согласно данным последних лет, обратимый ВЦ, функционирующий в липидном матриксе тилакоидов, осуществляет рецепцию и трансдукцию стрессорного сигнала (Hieber и др., 2004). Ионы водорода являются материальными носителями стрессорного сигнала. Предполагают, что рецептор, отслеживающий возбужденное состояние хлорофилл-белковых комплексов, представляет собой фермент VDE. Зеаксантин, образующийся из виолаксантина, выполняет роль вторичного мессенджера (посредника), который связывается с белками-мишенями в ССК ФС1 и 2. Функции зеаксантина в множественных связывающих сайтах на молекулярном уровне в полной мере не исследованы. По данным Ма с сопр. (Ма и др., 2003) зеаксантин увеличивает долю тепловой диссипации поглощенных квантов света путем тушения возбужденных синглетных состояний хлорофилла в ССК ФС2. Тем самым предотвращается образование избыточных количеств синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$ или $^1\text{O}_2$) в ФС 2 по реакции (Havaux, Niyogi, 1999):



В защите незакаленных растений от холодового шока – быстрого снижения температуры – принимают участие системы, вызывающие термогенез и локальное повышение температуры (Колесниченко, Войников, 2003). Полученные нами результаты позволяют сделать предположение о том, что «фотофизическая» часть фотосинтеза, включающая поглощение энергии света, процессы миграции и преобразования энергии с участием пигментов ВЦ, несомненно, принимает участие в термогенезе и может иметь большое значение в устойчивости растений Севера к низким положительным температурам.

ЛИТЕРАТУРА

- Бухов, Н.Г. (2004) Динамическая световая регуляция фотосинтеза. *Физиология растений*, **51**, 825-837.
- Колесниченко, А.В., Войников, В.К. (2003) *Белки низкотемпературного стресса растений*. Арт-Пресс, Иркутск, Россия.
- Сахарова, О.В. (1969) Определение пигментов в пластидах зеленых растений // Методы комплексного изучения фотосинтеза. В: Сапожников, Д.И. (ред.), *Методы комплексного изучения фотосинтеза*. Наука, Л., сс.165-180.
- Demmig-Adams, B. (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophylls zeaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1020**, 1-24.
- Demmig-Adams, B., Gilmore, A.M. and Adams, W.W., III. (1996) *In vivo* functions of carotenoids in plants. *FASEB J.*, **10**, 403-412.
- Havaux, M. and Niyogi, K.K. (1999) The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc. Natl Acad.Sci. USA*, **96**, 8762-8767.
- Heber, U. and Walker, D.A. (1992) Concerning a dual function of coupled cyclic electron transport in leaves. *Plant Physiol.* **100**, 1621-1626.
- Hieber, A.D., Kawabata, O. and Yamamoto, H.Y. (2004) Significance of the lipid phase in the dynamics and functions of the xanthophyll cycle as revealed by PsbS overexpression in tobacco and in-vitro de-epoxidation in monogalactosyldiacylglycerol Micelles. *Plant Cell Physiol.*, **45** (1), 92-102.
- Horton, P., Ruban, A.V. and Walters, R.G. (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**, 655-684.
- Lichtenhaller, H.K. and Wellburn, A.K. (1983) Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem.Soc.Trans.*, **11**, 591-592.
- Ma, Y. Z., Holt, N.E., Li, X.P., Niyogu, K.K. and Fleming, G.R. (2003) Evidence for direct carotenoid involvement in the regulation of photosynthetic light harvesting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 4377-4282.
- Miller, N.J., Sampson, J., Candeias, L.P., Bramley, P.M and Rice-Evans, C.A. (1996) Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, **384**, 240-242.
- Neubauer, C. and Yamamoto, H.Y. (1992) Methler-peroxidase reaction mediates zeaxanthin formation and zeaxanthin-related fluorescence quenching in intact chloroplasts. *Plant Physiol.* **99**, 1354-1361.
- Siefermann-Harms, D. (1987) The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiologia Plantarum*, **69**, 561-568.
- Tefler, A., Dhami, S., Bishop, S.M., Phillips, D. and Barber, J. (1994) β -Carotene quenches singlet oxygen formed by isolated photosystem II reaction centers. *Biochemistry*, **33**, 14469-14474.