МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
Биологический факультет

003461235

На правах рукописи

СОЛОВЧЕНКО Алексей Евгеньевич

ЭКРАНИРОВАНИЕ ВИДИМОГО И УФ ИЗЛУЧЕНИЯ КАК ФОТОЗАЩИТНЫЙ МЕХАНИЗМ РАСТЕНИЙ

специальность: 03.00.12 — физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

12 ФЕВ 2009

Москва – 2009

Работа выполнена на кафедре физиологии микроорганизмов Биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор М.Н. Мерзляк

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор	**А.М. Носов**
Доктор биологических наук, профессор	**А.Я. Потапенко**
Доктор биологических наук, профессор	**И.Г. Тараканов**

Ведущая организация: Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

Защита состоится 27 февраля 2009 года в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного Совета Д 501.001.46 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, биологический факультет, аудитория М-1, тел./факс (495) 939-43-09.

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

Автореферат разослан 26 января 2009 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук М.А. Гусаковская

Актуальность проблемы. Существование растений как фотоавтотрофов неразрывно связано с поглощением и утилизацией энергии солнечного излучения в ходе фотосинтеза. Основные пигменты растений, локализованные в тилакоидных мембранах хлоропластов, способны эффективно улавливать кванты света и передавать их энергию другим компонентам ФСА[1] для синтеза АТФ и НАДФН, фиксации CO_2 и т.д. [Бухов, 2001; Ладыгин, 2002; Horton, Ruban, 2004]. При этом с оптимальной скоростью фотосинтез осуществляется в довольно узком диапазоне интенсивностей света, в результате даже при относительно невысоких потоках не вся световая энергия, поглощенная ФСА, может быть использована в фотохимических реакциях [Ort, 2001; Ensminger *et al.*, 2006]. Дисбаланс между поглощенной энергией света и способностью растения к ее утилизации также возникает при действии экстремальных температур, засухи, дефицита элементов минерального питания [Ensminger *et al.*, 2006], на ювенильных стадиях развития и при старении растений [Steyn *et al.*, 2002; Hoch *et al.*, 2003]. Часто в подобных ситуациях происходит повышение уровня активных форм кислорода (АФК), вызывающих фотоокислительные повреждения тканей, вплоть до гибели растений [Мерзляк, 1989; Asada, 2006]. Кроме того, наряду с хлорофиллами (Хл) в клетке содержится целый ряд соединений, таких как порфирины, Fe-S белки митохондрий, флавины и птерины, способных под действием облучения в видимой части спектра приводить к образованию АФК [Kim, Jung, 1995; Егоров и др., 1999; Foyer, Noctor, 2000]. Наряду с избыточным облучением в видимой части спектра (ФАР), повреждения растений могут быть связаны с действием УФ [Caldwell *et al.*, 1981–2003].

Необходимость защиты от повреждения солнечной радиацией обусловила возникновение у растений ряда адаптаций, включающих регуляторные и фотозащитные механизмы. Поскольку первые фототрофные организмы подвергались действию более жесткого УФ излучения, чем современные, считается, что ферментативные механизмы репарации УФ-индуцированного повреждения нуклеиновых кислот и ресинтеза важных белков ФСА возникли в процессе эволюции одними из первых [Cockell, Knowland, 1999; Niyogi, 1999]. Универсальными и важнейшими для растений являются ферментативные и неферментативные системы дезактивации АФК, играющие ключевую роль в предотвращении фотоповреждений окислительного характера [Иванов, Мерзляк, Elstner, 1972–1989; Foyer, Noctor, 2000; Asada, 2006]. Другие механизмы, обеспечивающие эффективное протекание фотосинтеза в широком диапазоне длин волн и потоков радиации, включают перераспреде-

---

[1] Список сокращений: **$^1O_2$** — синглетный кислород; **^{3}Хл** — триплетное возбужденное состояние хлорофилла; **β-кар** — β-каротин; **Ант** — антоцианы, **Антера** — антераксантин; **АФК** — активные формы кислорода; **Вио** — виолаксантин; **ЖК** — жирные кислоты; **Зеа** — зеаксантин; **Кар** — каротиноиды, **ЛГ** — липидные глобулы; **Лют** — лютеин; **Нео** — неоксантин; **Ркс** — родоксантин; **Хл** — хлорофилл(ы), **ФеС** — фенольные соединения; **Фл** — флавонолы; **ФС** — фотосистема; **ФСА** — фотосинтетический аппарат; **ЭК** — эфиры ксантофиллов; R_λ — коэффицент отражения при длине волны λ.

ление потока поглощенной ФАР между ФС, изменение стехиометрии ФС I, ФС II и компонентов ССК, диссипацию энергии возбуждения Хл в виде тепла и тушение ^{3}Хл и $^1O_2$ [Demmig-Adams, Adams, 1992; Бухов, 2001; Ладыгин, 2002; Horton, Ruban, 2004].

Согласно общепринятым представлениям, фотозащитными являются все перечисленные выше механизмы, предотвращающие фотоповреждение ФСА и обеспечивающие его стабильную работу в широком диапазоне условий окружающей среды [Иванов, Мерзляк, Asada, 1980–2006]. В нашей работе основное внимание уделяется существенно менее изученным экстратилакоидным пигментам, ослабляющим достигающее тилакоидов излучение, а также фотозащитным механизмам, основанным на экранировании УФ и избытка ФАР. Эти механизмы, представляющие большой интерес для исследования адаптационных возможностей растений, были выделены и охарактеризованы сравнительно недавно, но уже привлекают значительное внимание исследователей [Day *et al.*, 1993, 1994; Карапетян, 1999; Bornman *et al.*, 1997; Cockell, Knowland, 1999; Mazza *et al.*, 2000; Shick, Dunlap, 2002; Steyn *et al.*, 2002; Hormaetxe *et al.*, 2005; Merzlyak *et al.*, 2000–2008]. Ключевой особенностью механизмов этого типа является устранение *причин* фотоповреждения — чрезмерного поглощения солнечной радиации пигментным аппаратом и облучения других фоточувствительных компонентов и эндогенных фотосенсибилизаторов клетки.

В основе этих механизмов лежит способность растений синтезировать и накапливать под действием сильного излучения в различных компартментах клеток и структурах тканей фотозащитные пигменты — соединения, селективно поглощающие в УФ и видимой частях спектра и конкурирующие за поглощение квантов с фотосинтетическими пигментами (Хл и Кар, локализованными в тилакоидах) [Bornman *et al.*, 1997; Cockell, Knowland, 1999; Shick, Dunlap, 2002; Merzlyak *et al.*, 2000–2008]. Большинство фотозащитных пигментов растений принадлежит к четырем основным группам соединений: микоспоринподобным аминокислотам, ФеС, Кар и беталаинам [Shick, Dunlap, 2002; Запрометов, 1993; Harborne, Williams, 2000; Strack *et al.*, 2003]. К *началу наших исследований* отдельные классы фотозащитных пигментов были обнаружены практически у всех видов растений [Запрометов, 1993; Ладыгин, 2000, 2002; Harborne, Williams, 2000; Strack *et al.*, 2003], и во многих случаях была доказана и описана их фотозащитная функция. Полученные к настоящему времени сведения позволяют полагать, что фотозащитные соединения участвуют в долговременной адаптации растений [Cockell, Knowland, 1999; Steyn *et al.*, 2002; Hoch *et al.*, 2003; Merzlyak *et al.*, 1999–2007]. Несмотря на значительные успехи в изучении биохимии фотозащитных пигментов, к настоящему времени еще не сформированы четкие представления о значении конкретных пигментов для защиты растений от фотоповреждения. Так, для многих видов растений отсутствуют данные о динамике содержа-

ния, спектральных свойствах *in vivo* и эффективности фотозащитного действия, а имеющиеся сведения фрагментарны и нуждаются в систематизации. В особой степени это относится к пигментам, экранирующим излучение в видимой области спектра, фотопротекторная роль которых в настоящее время мало изучена по сравнению с таковой ФеС, участвующих в защите от УФ-В [Bornman *et al.*, 1997: Cockell, Knowland, 1999].

Из сказанного ясно, что исследование роли пигментов в фотоадаптации и защите от фотоповреждения у растений различных систематических групп относится к актуальным разделам физиологии растений и фотобиологии, а изучение их состава, динамики, локализации и особенностей спектроскопии *in vivo* входит в число направлений, приоритетных в данной области. Мы считаем, что данные исследования могут быть выделены в качестве самостоятельной проблемы, актуальность которой обусловлена необходимостью расширения текущих представлений об адаптационных возможностях и механизмах фотоавтотрофных организмов.

Цели и задачи исследования. Работа посвящена изучению роли пигментов, экранирующих видимое и УФ излучение, в долговременной адаптации растений к действию высоких потоков солнечной радиации и защите от фотоповреждения. Основная цель работы — выявление закономерностей изменения состава, оптических свойств *in vivo* и *in vitro*, а также физиологической роли различных групп пигментов при фотоадаптации и фотоповреждении у растений.

Задачи исследования:

1) исследование динамики содержания, состава и соотношения различных групп фотозащитных пигментов при адаптации к интенсивному солнечному свету и повреждении им растений на разных этапах онтогенеза;
2) изучение субклеточной локализации и оптических свойств пигментов *in vivo* в тканях высших растений, клетках микроводорослей, а также отдельных пластидах и вакуолях при адаптации к высоким потокам солнечной радиации и при фотоповреждении;
3) выяснение ролей различных форм Кар и ФеС в долговременной адаптации растений, различающихся по способности к биосинтезу фотозащитных пигментов;
4) исследование значения различных ФеС (фенольных кислот, Фл и Ант) для формировании устойчивости ФСА высших растений к повреждению, вызванному УФ и ФАР;
5) разработка новых и совершенствование существующих недеструктивных методов анализа пигментов *in situ* и мониторинга физиологического состояния растений.

Научная новизна работы. В результате изучения представителей разных таксономических групп растений в экспериментальных и природных условиях, взывающих индукцию основанных на экранировании видимого и УФ излучения механизмов фотоадап-

тации и, в отдельных случаях, фотоповреждение, впервые описаны особенности динамики состава, а также спектроскопия *in vivo* для ряда фотозащитных пигментов; охарактеризована их роль в защите от повреждения видимой и УФ радиацией. Сформулированы новые и значительно расширены существующие представления о физиологическом значении различных групп пигментов в адаптации растений к интенсивности и спектральному составу освещения и защите от фотоповреждений. Установлено, что при длительном воздействии на растения интенсивного солнечного излучения ограничение количества световой энергии, поглощаемой фотосинтетическим аппаратом при участии фотозащитных пигментов, может являться эффективным дополнением «классических» фотозащитных механизмов, таких как элиминация АФК и тепловая диссипация избытка поглощенной ФАР.

Охарактеризованы закономерности динамики состава и содержания ФеС и экстратилакоидных Кар в высших растениях при адаптации к действию интенсивного солнечного света и его УФ компонента. Выявлены черты сходства трансформации фотосинтетических пигментов при старении ассимиляционных тканей растений и их адаптации к действию сильного солнечного света. Установлено, что УФ компонент солнечной радиации играет ключевую роль в индукции синтеза ФеС (Фл), обеспечивающих устойчивость к вызванному УФ фотоповреждению; именно эта группа индуцибельных ФеС играет ключевую роль в экранировании УФ-А излучения у растений. Показано, что экстратилакоидные Кар, накапливающиеся в липидных глобулах, могут играть важную роль в фотоадаптации микроводорослей и высших растений, главным образом, за счет экранирования избыточного видимого излучения.

Впервые получены спектральные характеристики *in vivo* для ряда фотозащитных пигментов (Кар, Фл, Ант), накапливаемых растениями в условиях стресса в кутикуле, вакуолях, пластидах и цитоплазматических включениях. Описана локализация и оптические свойства экстратилакоидных Кар высших растений и зеленых микроводорослей на уровне отдельных пластид. Выявлены общие черты ультраструктурных изменений пластид при адаптации к сильному свету, недостатку азота, а также при старении растений. Установлено, что различные фотозащитные пигменты способны формировать в растениях «экраны» и «ловушки», эффективно ослабляющие излучение в широком диапазоне спектра, от УФ-В до красной области. Показано, что отличные по химической природе и локализации пигменты, такие как экстратилакоидные Кар и Ант, могут играть сходную роль в защите от повреждения растений в силу сходства их спектральных свойств.

Получены новые данные об изменении оптических свойств растений при фотоадаптации и фотоповреждении, а также сведения о влиянии на них накопления фотоза-

щитных пигментов, позволившие значительно расширить возможности интерпретации спектральных данных и дополнить методологию недеструктивного анализа пигментов. На основании анализа собственных и литературных данных разработана концепция, согласно которой способность растений к биосинтезу определенных групп фотозащитных пигментов является важным компонентом стратегии их долговременной фотоадаптации.

Положения, выносимые на защиту. На основании анализа собственных и опубликованных в литературе данных о механизмах функционирования и физиологической роли фотозащитных пигментов можно заключить следующее:

1) фотозащитные механизмы, основанные на экранировании видимого и УФ излучения пигментами (такими, как экстратилакоидные Кар, Фл и Ант), играют одну из ключевых ролей в долговременной фотоадаптации и защите растений от фотоповреждения на различных этапах онтогенеза;
2) «экранирующие» пигменты задерживают значительную часть излучения в широком спектральном диапазоне, поглощаемую в их отсутствие пигментами ФСА. Особенности спектроскопии «экранирующих» пигментов *in vivo* (батохромные сдвиги максимумов и уширение полос поглощения), важны для их фотозащитной функции;
3) изменения содержания и состава пигментов растений при адаптации к высоким потокам солнечного света направлены на снижение поглощения радиации компонентами ФСА и эндогенными сенсибилизаторами, присутствующими в растительной клетке, часто за счет накопления «экранирующих» пигментов;
4) адаптация к интенсивному солнечному излучению во многих случаях сопровождается характерными изменениями ультраструктуры клеток: деградацией гранально-ламеллярной системы хлоропластов и образованием липидных включений. Экстратилакоидные Кар, локализованные в этих структурах, обладают высокой фотостабильностью и способны задерживать значительную часть излучения в синей области;
5) устойчивость фотосинтетического аппарата к повреждению видимым и УФ излучением в значительной степени зависит от содержания пигментов, экранирующих излучение в этих диапазонах. У видов растений, неспособных к синтезу высоких количеств определенных фотозащитных пигментов, функции этих пигментов восполняются другими соединениями, иными по химической природе и субклеточной локализации, но обладающими сходными спектральным свойствам *in vivo*.

Научно-практическая значимость. Полученные экспериментальные данные расширяют существующие представления о механизмах и стратегиях долговременной адаптации растений к высоким потокам солнечного излучения, а также о роли экстратилакоидных Кар и ФеС в этих процессах. Результаты работы способствуют углублению пони-

мания физиологической и экологической роли фотозащитных механизмов, основанных на индукции синтеза пигментов, экранирующих избыток ФАР; они также важны с точки зрения исследования адаптации растений к изменяющимся условиям среды, в том числе при постоянно возрастающем антропогенном воздействии.

Разработаны новые и усовершенствованы существующие методы для недеструктивного изучения пигментного состава фотосинтезирующих тканей *in situ*, позволяющие оперативно получать ценную информацию о физиологическом состоянии объекта, не разрушая его. Использование этих методов открывает новые возможности для мониторинга фотоадаптации и фотоповреждения высших растений и водорослей, а также старения листьев и созревания плодов. Полученные экспериментальные данные могут служить основанием для включения недеструктивного анализа пигментов в арсенал методов физиологии растений, разработки подходов к экспресс-оценке состояния фотоавтотрофных организмов и методов биоиндикации, применяемых для экологического мониторинга.

Практическая ценность работы в значительной степени определяется выбором в качестве объектов микроводорослей (*Parietochloris incisa*) и растений (*Aloe arborescens*), продуцирующих ценные биологически активные соединения, а также плодовых растений (*Malus* × *domestica*). Результаты проведенных нами исследований важны для: 1) изучения механизмов фотоадаптации и фотоокислительной гибели микроводорослей — продуцентов арахидоновой кислоты; 2) оптимизации фотобиотехнологии, основанной на использовании этих микроводорослей в плане выхода биомассы и степени обогащения ее ценными ПНЖК; 3) недеструктивного мониторинга и прогноза созревания яблок в саду и при хранении снятых плодов, а также для выявления и контроля развития физиологических расстройств плодов (таких, как подкожный загар, стекловидность и солнечный ожог).

Научные представления, основные методические приемы и принципы исследований, полученные в ходе проведенных работ, включены в задачи большого и малого практикума по физиологии растений и микроорганизмов, практикумы и лекционные курсы «Биологическая спектроскопия», «Взаимодействие патогенных микроорганизмов с растениями» и «Фотофизиология микроорганизмов» для студентов кафедр физиологии микроорганизмов, физиологии растений, микологии и альгологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Апробация работы. Материалы работы заслушивались на совместных заседаниях кафедр физиологии растений, физиологии микроорганизмов, микологии и альгологии МГУ. Основные положения диссертации представлены на 35 съездах и конференциях, среди которых *всероссийские*: III Съезд фотобиологов России (Воронеж, 2001); V Съезд общества физиологов растений России (Пенза, 2003); VI Симпозиум по фенольным со-

единениям (Москва, 2004); III Съезд Биофизиков России (Воронеж, 2004); «Актуальные проблемы биологии и экологии» (Сыктывкар, 2005); IV Съезд фотобиологов России (Саратов, 2005); Всероссийский симпозиум «Автотрофные микроорганизмы» памяти академика Е.Н. Кондратьевой (Москва, 2005); *международные*: «Plants under Environmental Stress» (Москва, 2001); The 5th Conference on Oxygen, Free Radicals and Oxidative Stress in Plants, (Ницца, 2001); «Биотехнология — состояние и перспективы развития» (Москва, 2005); «Skin & Environment» (Москва – Санкт-Петербург, 2005); 43rd Conference on Horticultural Science (Потсдам, 2006); I Международная конференция «Физиология микроорганизмов в природных и экспериментальных системах» (Москва, 2006); «Photosynthesis in the Post-Genomic Era: «Structure and Function of Photosynthesis» (Пущино, 2006); Международная конференция «Современная физиология растений: от молекул до экосистем» (Москва, 2007); 2nd Conference on Precision Crop Protection (Бонн, 2007); «Light Energy Conversion in Photosynthesis», Пущино, 2008; V Съезд Российского фотобиологического общества; годичное собрание ОФР (Екатеринбург, 2008).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 7 глав и заключения, включающих обзор литературы, описание объектов и методов исследования, изложение и обсуждение полученных результатов, заключение, основные выводы и список использованных литературных источников. Работа изложена на 410 страницах машинописного текста, включает 5 таблиц и 122 рисунка. Список литературных источников содержит 525 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Глава I. Разнообразие и функции фотозащитных пигментов у растений

Представлен обзор литературы, посвященной исследованию структуры, распространенности, оптических свойств *in vitro* и *in vivo*, а также эволюции, особенностей функционирования и физиологической роли фотозащитных пигментов у различных таксономических групп растений.

Глава II. Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили растительные организмы (табл. 1), обладающие выраженными ответами пигментного аппарата на действие высоких потоков видимого и УФ излучения. В качестве модельной системы для изучения фотоадаптации микроводорослей в норме и при действии стресса выбрана пресноводная зеленая водоросль *P. incisa*, которая в природных условиях подвергается воздействию высокой освещенности, экстремальных температур и дефицита минерального питания, в частности, азота

[Watanabe *et al.*, 1996]. Накопление и локализацию Ант у высших растений изучали на примере видов, ювенильные и(или) стареющие (осенние) листья которых приобретают красную окраску, особенно выраженную при действии интенсивного солнечного света на фоне низких температур [Merzlyak, Gitelson, 1995–1999; Merzlyak *et al.*, 2008]. Плоды яб-

Таблица 1. Объекты исследования и их происхождение

Объект		Число образцов	Место выращивания	Год
Одноклеточные водоросли				
Одноклеточная водоросль *Parietochloris incisa* comb. nov (Chlorophyta, Trebuxiophyceae)		220	Лаборатория биотехнологии микроводорослей, Блаушейновский институт изучения пустынь, Университет Бен-Гуриона, Израиль	2004–2008
		14	Кафедра физиологии микроорганизмов МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва	
Высшие растения (листья)				
Алоэ древовидное (*Aloe arborescens* Mill., Liliaceae)		75	Лаборатория интродукции Блаушейновского института изучения пустынь, Университет Бен-Гуриона, Израиль	2004–2008
Клен платановидный (*Acer platanoides* L., Aceraceae)		105	Ботанический сад МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва	2005–2006
Дерен (*Cornus alba* L., Cornaceae)		25		2005–2008
Виноград дикий (*Parthenocissus quinquefolia*, (Siebold. & Zucc.) Planch, Vitaceae)		75		2005–2008
Кизильник (*Cotoneaster integerrimus* Medik., Rosaceae)		25		2005–2006
Лещина обыкновенная (*Corylus avellana* L., Corylaceae)		125		2006–2008
Высшие растения (плоды)				
Яблоня домашняя (*Malus× domestica* Borkh., Rosaceae)	*Сорт*	156	Ботанический сад МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва	1999–2005
	Антоновка Обыкновенная	212	ОПХ Всероссийского НИИ садоводства им. И.В. Мичурина, г. Мичуринск Тамбовской обл.	1993–2008
	Жигулевское	50		1999–2001
	Ренет Симиренко	12		2000
	Гранни Смит	10		
		260	Экспериментальная станция Klein-Altendorf, Институт садоводства Рейнского университета, г. Бонн, Германия	2001–2005
	Брэберн	260		
	Пинк Леди	50		

лони были выбраны в качестве объектов исследования, поскольку они представляют собой уникальную природную систему, удобную для изучения процессов фотоадаптации и фотоповреждения у растений [Andrews, 1997, 1998; Merzlyak *et al.*, 1998–2003]. В течение развития плода на одну из его поверхностей, обращенную к периферии кроны («солнечную» поверхность), падает высокий поток прямого солнечного излучения, тогда как на поверхность плода, обращенную к центру кроны («теневую» поверхность), падает преимущественно рассеянное излучение меньшей интенсивности, в остальном ткани плода находятся в идентичных условиях [Andrews, 1997]. В результате ткани на солнечной поверхности оказываются адаптированными к более высоким потокам солнечного света, чем ткани на теневой поверхности, что делает возможным парное сравнение параметров, измеренных на солнечной и теневой поверхностях одного и того же плода [Merzlyak, Chivkunova, 2000].

Условия облучения. Данные об интенсивности ФАР и УФ в естественном солнечном излучении для экспериментов, выполненных в Германии, получали из лаборатории мониторинга погодных условий Института Макса Планка (Кельн, Германия). В экспериментах с блокированием солнечного УФ использовали защитную пленку Folitec UV-5 (Agrarfolien-Vertriebs, Германия), коэффициент пропускания > 1% при длинах волн меньше 390 нм. Интенсивность УФ и видимого излучения измеряли, соответственно, квантометрами Gröbel (Германия) и Newport (США). Целые плоды, листья и экстракты облучали, используя в качестве источника излучения диапроектор «Свитязь» с галогенной лампой накаливания КГМ 150/24 (НПО «Светотехника», Саранск) мощностью 150 Вт, через 5-см водный фильтр и 5-мм граничный светофильтр БС-8 (макс. плотность мощности на объекте 2500 Вт/м^2). Источником УФ-В служил осветитель с 10 лампами Phillips TL-100 (Германия) мощностью по 100 Вт (макс. плотность мощности на объекте 40 Вт/м^2).

Выделение тилакоидов и ЛГ из клеток *P. incisa* осуществляли методом центрифугирования гомогенатов в градиенте плотности сахарозы [Khozin-Goldberg *et al.*, 2002].

Препараты кутикулы плодов яблони получали путем ферментативной мацерации срезов кожицы по Ju, Bramlage (1999) с модификациями [Solovchenko, Merzlyak, 2003].

Содержание пигментов определяли спектрофотометрически в ацетоновых экстрактах [Lichtenthaler, 1987] либо хлороформных [Wellburn, 1994] и водно-метанольных фракциях экстрактов по методу Folch [Folch *et al.*, 1957; Соловченко и др., 2001]. В отдельных экспериментах с плодами яблони использовали ранее разработанные с участием автора методы недеструктивного анализа пигментов [Merzlyak *et al.*, 2003, 2005].

Анализ пигментов осуществляли с использованием традиционных [Strack, Wray, 1989] и разработанных с участием автора [Solovchenko, Schmitz-Eiberger, 2003; Merzlyak *et*

al., 2005; Solovchenko *et al.*, 2006] методов ТСХ и ВЭЖХ на хроматографах Knauer, Merck-Hitachi (Германия), Hewlett-Packard (США), оснащенных колонками с обращенной фазой.

Анализ ЖК *P. incisa* осуществляли путем трансметилирования с последующей ГЖХ на хроматографе Hewlett-Packard с капиллярной колонкой [Cohen *et al.*, 1993].

Световая микроскопия. Микрофотографии временных препаратов клеток *P. incisa*, а также срезов листьев *A. arborescens* и кожицы плодов *M.* × *domestica* получали на фотомикроскопе Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия). Люминесцентные микрофотографии получали на микроскопе Axiophot (Opton, Германия), оснащенном ртутной лампой HBO 50 в качестве источника возбуждающего света.

Электронная микроскопия. Клетки *P. incisa* фиксировали согласно [Korzhenevskaya *et al.* 1993]. Для препаратов листьев алоэ и кожицы плодов яблони использовали два вида фиксации: глутаровый альдегид + MnO_4 либо *p*-формальдегид + глутаровый альдегид + OsO_4 Контрастирование проводили уранил-ацетатом (в 70 % этаноле) при обезвоживании и цитратом свинца на ультратонких срезах. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме LKB-8800 (Швеция) и микроскопировали при помощи трансмиссионного электронного микроскопа JEM-100 B (Япония).

Спектральные измерения осуществляли на спектрофотометрах Hitachi 150-20 (Hitachi, Япония; оснащен интегрирующей сферой с внутренним диаметром 150 мм), Lambda 5 (Perkin-Elmer, США), Cary 50 Bio (Varian, США) Ocean Optics USB2000 (Ocean Optics, США; оснащен интегрирующей сферой диаметром 50 мм, выполненной из спектралона). Спектры записывали в стандартных 1-сантиметровых кюветах, спектры поглощения клеточных суспензий регистрировали против сред культивирования, спектры поглощения экстрактов — против соответствующих растворителей, а спектры отражения листьев и плодов — против $BaSO_4$; в некоторых случаях в качестве стандарта использовали покрытие на основе мелкодисперсного $BaSO_4$ (Munsell, США). Спектральные данные оцифровывали с шагом 2 нм и обрабатывали в электронных таблицах. Спектры поглощения отдельных пластид и вакуолей были измерены на препаратах срезов листьев с использованием модифицированного микроспектрофотометра Leitz MPV2 (Ernst Leitz Wetzlar, Германия), оснащенного 150-Вт ксеноновой лампой высокого давления в качестве источника света и спектрофотометром USB2000 (Ocean Optics, США) в качестве детектора (подробное описание методики измерений см. в [Merzlyak *et al.*, 2005]).

Обработка спектральных данных. Спектральные вклады каротиноидов и примесей в поглощение экстрактов («остаточные» спектры) рассчитывали вычитанием спектров поглощения хлорофиллов *a* и *b* [Мерзляк и др., 1996; Соловченко и др., 2001]. Для компенсации спектров поглощения клеточных суспензий микроводорослей на рассеяние ис-

пользовали ранее описанный метод [Merzlyak *et al.*, 2000, 2007]. Исходя из допущения, что в случае поверхности плода $R = R_\infty$, спектры отражения плодов $R(\lambda)$ для дальнейшего анализа были преобразованы в спектры функции ремиссии $f(R)$, аналогичной функции Кубелки-Мунка $f(R_\infty)$ [Kortüm, 1969]. Измеренные спектры пропускания кутикулы, $T_m(\lambda)$, и ее спектры поглощения для неотраженного света, $A_m(\lambda)$, подвергали коррекции [Solovchenko, Merzlyak, 2003], процедура коррекции спектров кожицы яблок мало отличалась от таковой для листьев высших растений (см. [Merzlyak *et al.*, 2002]).

Измерения переменной флуоресценции Хл. Минимальную (Fo) и максимальную (Fm) флуоресценцию Хл кожицы плодов измеряли при помощи импульсного модулированного флуориметра PAM-2000 (фирма «Heinz Walz», Effeltrich, Germany), оснащенного вместо зажима для листовой пластинки специально изготовленной насадкой. Измерения проводили после темновой адаптации объектов в течение 30 мин; Fo измеряли после воздействия слабого модулированного измеряющего луча (< 0,1 мкЕ при 650 нм), Fm — после кратковременного (0,2 с) насыщающего импульса белого света (3000 мкЕ ФАР). Минимальный и максимальный уровни флуоресценции Хл в клетках водорослей, адаптированных к темноте (Fo, Fm) и свету (Fo', Fm') измеряли с помощью импульсных флуориметров PEA (Hansatech, Великобритания) и FluorPen PS100 (PSI, Чехия). По результатам анализа переменной флуоресценции Хл рассчитывали максимальную квантовую эффективность фотосистемы II; уровень фотохимического и нефотохимического тушения, а также скорость линейного транспорта электронов в ЭТЦ хлоропластов [Schreiber, 1989; Roháček, 2002].

Глава III. Изменения оптических свойств растений под влиянием фотозащитных пигментов и разработка недеструктивных методов их анализа

Исследования, ранее выполненные в нашей [Мерзляк и др., 1995–2007; Gitelson *et al.*, 1992–2003; Merzlyak *et al.*, 1998–2008] и других лабораториях [Peñuelas, Filella, 1998; Gamon *et al.*, 1991–2001] показали, что адаптивные перестройки пигментного аппарата, включая накопление фотозащитных пигментов, с неизбежностью проявляются в оптических свойствах растений. Исследование спектров отражения, поглощения и рассеяния позволяет количественно описать взаимодействие света с растениями, а также получить ценную информацию о состоянии их ФСА и фотозащитных механизмов [Мерзляк и др., 2003]. В этой связи первые этапы работы были посвящены выявлению и анализу характерных изменений оптических свойств, сопровождающих адаптивные изменения пигментного состава водорослей и высших растений при действии высоких потоков ФАР и

УФ излучения. В ходе исследований были измерены, обработаны и проанализированы спектры поглощения клеточных суспензий микроводоросли *P. incisa*, а также спектры поглощения и отражения листьев, препаратов покровных структур (гиподермы и кутикулы) и целых плодов яблони. Изучали спектральную характеристику Кар, Фл и Ант *in situ* с целью количественной оценки их вклада в поглощение клетками и тканями растений излучения в различных диапазонах и потенциального фотозащитного эффекта этих пигментов.

Вклад фотозащитных Кар в поглощение ФАР *in situ*. Исследование спектров поглощения сильно рассеивающих свет суспензий микроорганизмов, в том числе микроводорослей, сопряжено с трудностями из-за неопределенного вклада рассеяния даже при использовании интегрирующих сфер [Merzlyak, Naqvi, 2000]. Однако применение недавно разработанных методов компенсации на рассеяние [Merzlyak, Naqvi, 2000; Мерзляк и др., 2008] позволило получить спектры суспензий микроводоросли *P. incisa*, практически свободные от вклада рассеяния (рис. 1). Установлено, что в ходе роста этой водоросли при высокой интенсивности освещения повышение соотношения Кар/Хл и накопление фотозащитных Кар сопровождается ростом вклада соединений, поглощающих в синей области спектра и обладающих характерными максимумами при 480, 460 и плечом при 430 нм.

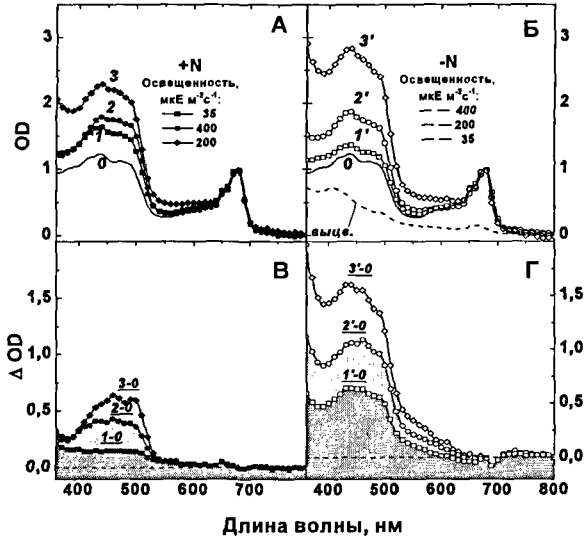

Рис. 1. Средние корректированные на рассеяние спектры поглощения (*1-3*) суспензий клеток *P. incisa* с различным соотношением каротиноидов и хлорофиллов, выращенных на полной среде (А) и в отсутствие азота (Б) и их дифференциальные спектры (В, Г)

Результаты анализа дифференциальных спектров суспензий с разным соотношением Кар/Хл и сопоставление их с данными биохимического анализа пигментов позволило отнести возрастающее поглощение суспензий в синей области спектра на счет вклада Кар (см. гл. 5), накапливающихся при действии интенсивного освещения. Эти данные свидетельствуют о том, что экстратилакоидные Кар способны перехватывать значительную часть света, который в их отсутствие поглощается Хл (особенно Хл *b*), и конкурировать с «фотосинтетическими» Кар за поглощение света в синей области спектра.

Сравнительный анализ нормированных и дифференциальных спектров отражения плодов яблони, снятых с теневой и солнечной поверхностей, а также спектров обратных коэффициентов отражения и функции ремиссии Кубелки-Мунка, $f(R)$, также выявил, наряду со снижением содержания Хл, повышение вклада соединений, очень близких к Кар по характеру спектральных деталей в синей области. Этот вклад был существенно выше на солнечной поверхности, чем на теневой. На заключительных этапах созревания плодов, когда в составе их Кар обнаруживали высокие количества ЭК (рис. 8), Кар вносили доминирующий вклад в поглощение света.

Вклад Фл в поглощение УФ излучения *in situ* тканями высших растений. Анализ спектров целых растительных объектов, а также препаратов покровных тканей и кутикулы плодов показал, что, в зависимости от содержания Фл и спектрального диапазона, существенная часть падающей солнечной радиации может задерживаться кутикулой и эпидермой (более 98% излучения в УФ-В диапазоне и 80% в УФ-А). Установлено, что значительную часть УФ излучения в УФ-В диапазоне задерживали ФеС, ковалентно связанные с компонентами кутикулы и клеточной стенки, предположительно идентифицированные как производные оксикоричной кислоты. Нековалентно связанные с кутикулой Фл поглощали в длинноволновой части УФ-В, а также в УФ-А диапазоне.

Эксперименты с исключением УФ компонента из действующего на растения спектра солнечного излучения показали, что наиболее существенную часть УФ излучения, особенно в УФ-А и коротковолновой части видимого диапазона поглощают именно Фл, которые накапливаются в вакуолях эпидермы и гиподермы в ответ на действие высоких потоков солнечного УФ (рис. 2).

Следует отметить, что при высоком содержании Фл регистрировали очень низкое отражение плодов в широкой полосе от коротковолновой границы УФ-В до 410 нм (рис. 3), при этом положение минимума отражения было связано линейной зависимостью с содержанием Фл в широком диапазоне концентраций этих соединений (см. врезку на рис. 2). Несмотря на то, что УФ-В обладает бóльшей цитотоксичностью, УФ-А, интенсивность которого в солнечном излучении в десятки раз выше [Björn, Murphy, 1985], оказывает су-

щественное воздействие на растения. Так, максимальное ингибирование фотосинтеза при интенсивностях, характерных для естественных потоков солнечной радиации, наблюдается именно при действии УФ-А излучения [Bornman *et al.*, 1997; Caldwell *et al.*, 2003]. В силу этих обстоятельств велико значение обнаруженного длинноволнового поглощения Фл в диапазоне 350–410 нм, а также гиперхромные эффекты и батохромные сдвиги максимумов поглощения, влияющие на спектроскопию этих соединений *in vivo*.

Спектральные вклады Ант и Ркс *in situ*. Установлено, что при невысоком содержании хлорофиллов Ант перехватывают значительную часть солнечной радиации в зеленой части видимой области спектра [Merzlyak, Chivkunova, 2000]. Это существенно, поскольку, несмотря на невысокие коэффициенты поглощения Хл в зеленой области, максимум энергии в солнечном спектре приходится на эту область [Björn, Murphy, 1985]. Анализ спектров отражения плодов яблони при накоплении Ант (рис. 4) показал, что при накоплении этих пигментов в высоких количествах (> 20 нмоль/см^2) происходит уширение полосы их поглощения в видимой области спектра (вплоть до 600 нм). Можно сказать, что эффект накопления Ант в количествах, превышающих 40 нмоль/см^2, сравним с действием граничного светофильтра, задерживающего значительную часть излучения в полосе с λ < 600 нм (рис. 4); аналогичный эффект в полосе с λ < 415 нм проявляют Фл, накапливающиеся в количествах больше 100–120 нмоль/см^2 (рис. 3).

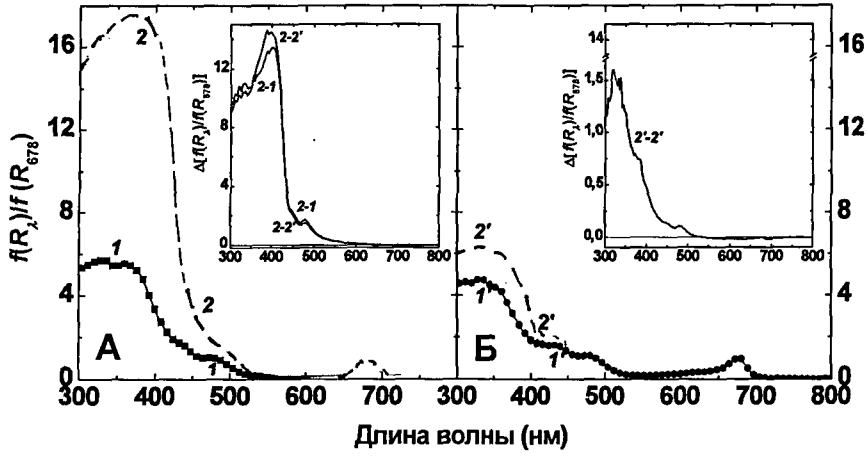

Рис. 2. Влияние солнечного УФ на оптические свойства плодов яблони сорта Антоновка. Приводятся спектры функции Кубелки-Мунка для теневой (*1*, *1'*) и солнечной (*2*, *2'*) поверхностей плодов, выращенных при действии полного солнечного спектра (А) и в отсутствие УФ (Б).

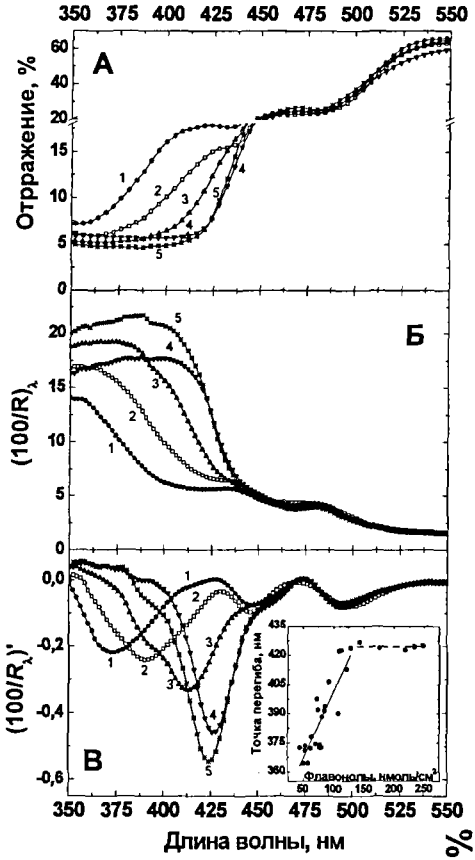

Рис. 3. Зависимость оптических свойств плодов яблони сорта Антоновка от содержания в них флавонолов. Показаны спектры отражения (А) с разным содержанием флавонолов (*1* – 45,7; 2 – 108,5; 3 – 121,8; 4 – 143,5; 5 – 233,8 нмоль/см^2), а также соответствующие им спектры функции 100/R(λ) и спектры их первой производной. *Врезка*: зависимость положения максимума первой производной спектров, показанных на панели Б, от содержания флавонолов.

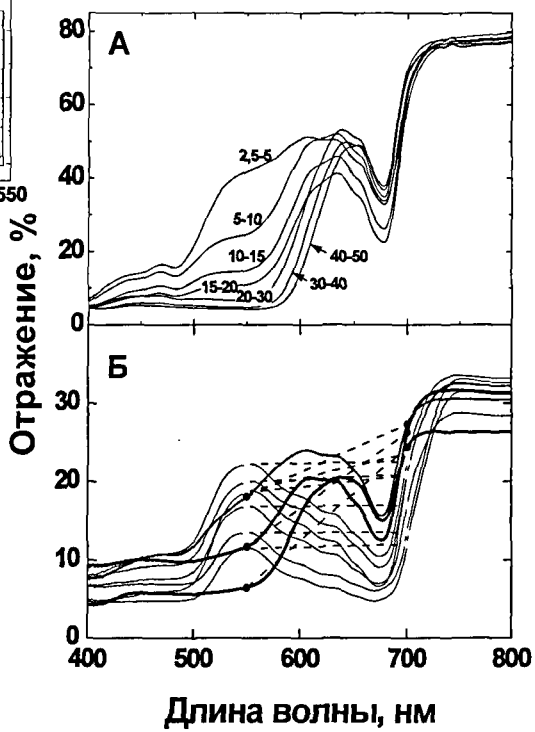

Рис. 4. Влияние накопления Ант на спектры отражения плодов яблони сорта Жигулевское (А) и накопления кетокаротиноида родоксантина на спектры отражения листьев *A. arborescens* (Б).
А: приводятся средние спектры, диапазоны содержания Ант указаны рядом с кривыми.
Б: линиями соединены коэффициенты отражения при 700 и 550 нм

Некоторые ретро- и кетокаротиноиды, такие как Ркс, *впервые обнаруженные у голосеменных* [Czeczuga, 1987], а затем и у цветковых растений [Diaz *et al.*, 1990], по форме спектра и положению максимумов *in vivo* чрезвычайно сходны с Ант и также способны поглощать значительную часть ФАР в зеленой области спектра [Han *et al.*, 2003, 2004]. Мы впервые проанализировали вклад Ркс в поглощение света *in situ* в растениях *A. arborescens*, накапливающих этот пигмент при действии высоких потоков солнечного излучения (эти растения обладают достаточно широкими листовыми пластинками, более удобными для спектральных измерений). Сравнительный анализ результатов микроспектрофотометрического анализа выявил наличие широкой полосы с максимумом в зеленой области (540–550 нм) на спектрах поглощения вакуолей клеток, содержащих Ант, а также красных пластид, содержащих Ркс. Судя по изменениям спектров отражения листьев *A. arborescens*, накопление Ркс сопровождалось повышением поглощения излучения в зеленой области видимого спектра (рис. 4Б), сравнимым с таковым при накоплении Ант в плодах яблони (рис. 4А). Таким образом, данные спектроскопии отражения и микроспектрофотометрии свидетельствуют, что Ант в плодах яблони и листьях, а также Ркс в листьях *A. arborescens*, обладая сходными спектральными характеристиками *in vivo*, способны к образованию эффективных экранов и ловушек для излучения в широкой полосе 450–600 нм, в которой солнечное излучение наиболее глубоко проникает в ткани листа [Sun *et al.*, 1998; Gitelson *et al.*, 2001].

Методы недеструктивного анализа пигментов и липидов. В ходе наших исследований с применением новых подходов к получению, обработке и анализу спектральной информации, в основном разработанных в нашей лаборатории [Мерзляк и др., 2003], был создан ряд экспресс-методов анализа пигментов и липидов в тканях и клетках растений по спектрам отражения и поглощения, отличающихся высокой чувствительностью и селективностью (табл. 2). Благодаря применению этих методов были прослежены изменения *суммарного содержания и соотношения* Хл и Кар, *а также Фл при фотоадаптации* созревающих плодов яблони. Кроме того, использование недеструктивных методов позволило нам надежно выявлять растительные объекты, подвергшиеся фотоповреждению.

Данные, полученные с применением недеструктивных методов, также позволили выявить закономерности изменения пигментного состава плодов и разработать модели, описывающие изменения содержания Кар и Хл в созревающих плодах в зависимости от исходного содержания Хл при разных уровнях освещенности. Разработанные модели были успешно использованы для прогноза динамики этих пигментов как в плодах, развивающихся на дереве, так и в отделенных плодах.

Таблица 2. Индексы для недеструктивного определения содержания пигментов и липидов

Индекс	Диапазон содержания, нмоль/см^2	Параметры уравнения регрессии*				
		n	r^{2**}	b	a	Ошибка определения, %
M. × *domestica* (плоды)						
Хлорофиллы *a* + *b*						
$R_{800}/R_{678} - 1$	0,3–5	148	0,92	–0,72	0,86	13,6
$R_{800}/R_{700} - 1$	0,2–11	166	0,94	0,01	0,11	0,9
$R_{800}/R_{640} - 1$	0,3–11	132	0,93	0,11	0,31	2,9
Каротиноиды						
$R_{800)}/R_{520} - R_{800}/R_{550}$	0,6–4,5	79	0,83	0,06	0,20	3,1
$R_{800}/R_{520} - R_{800}/R_{700}$	0,6–4,5	79	0,80	0,13	0,23	3,9
Молярное соотношение «каротиноиды/(хлорофиллы *a* + *b*)»						
$R_{500}/R_{800} - R_{678}/R_{800}$	0,34–2,65	78	0,88	–0,14	0,16	2,0
$R_{480}/R_{800} - R_{678}/R_{800}$	0,34–2,65	78	0,94	–0,09	0,20	1,3
Антоцианы						
$R_{800}/R_{550} - R_{800}/R_{700}$	5,0–48,1	23	0,93	–0,51	0,41	6,0
Флавонолы						
$R_{800}/R_{410} - R_{800}/R_{460}$	8,93–219	77	0,92	–5,08	12,8	
P. incisa (суспензии клеток)						
Сумма жирных кислот						
$\tilde{A}_{510}/\tilde{A}_{678}$ ***	0,09–3,04	46	0,84	–1,96	3,74	2,5
Арахидоновая кислота						
$\tilde{A}_{510}/\tilde{A}_{678}$	0,04–1,7	46	0,90	–0,95	1,94	1,5

Примечание: * уравнения линейной регрессии вида (значение индекса) = $a \cdot$ [содержание пигмента, нмоль/см^2] + b; ** $\alpha < 0{,}001$; *** $\tilde{A}_{(\lambda)}$ — $OD_{(\lambda)}$, корректированная на рассеяние [Merzlyak, Naqvi, 2000; Мерзляк и др., 2008].

Глава IV Динамика пигментного состава при фотоадаптации и фотоповреждении на разных этапах развития растений

Анализ полученных нами данных и сопоставление их с опубликованными в литературе сведениями позволяет выделить некоторые общие моменты в изменении спектров растительных объектов при повреждении высокими потоками света. Фотодеструкция пигментов в ассимилирующих клетках и тканях сопровождается глубоким синхронным выцветанием полос, обусловленных поглощением Кар и Хл, в красной и синей областях спектра.

Эта особенность наблюдалась у всех изученных растений. По-видимому, Хл является основным фотосенсибилизатором фотоокислительного повреждения ФСА, в том числе выцветания пигментов [Красновский, 1988; Мерзляк, 1989; Егоров и др., 1999]. Вместе с Хл [Мерзляк, 1989; Asada, 1987, 1994] могут разрушаться Кар, связанные с пигмент-белковыми комплексами тилакоидов [Merzlyak *et al.*, 1998; 2002] и участвующие в их защите от фотодеструкции [Young, 1991]. Разрушение Хл и Кар в этих случаях, по-видимому, происходит со стехиометрией, близкой к стехиометрии этих пигментов в интактных ассимиляционных тканях (2,5:1 – 3:1). Это может быть одной из причин наблюдаемой синхронности выцветания Хл и Кар под действием высоких потоков ФАР. Развитие некрозов на терминальной стадии повреждения плодов высокими потоками солнечного света, искусственной ФАР и УФ радиации, а также другими факторами (обработка *n*–гексаном, развитие подкожного загара [Barden, Bramlage, 1994; Bramlage, Weiss, 1997]) индуцировало сходные изменения в спектрах отражения плодов. В объектах с минимальным содержанием Хл побурение проявляется как монотонное снижение отражения по всему спектру. В случае плодов с высоким содержание Хл и Кар эти изменения были менее выражены в полосах поглощения пигментов вследствие перекрывания их с поглощением меланиноподобных пигментов, образующихся при побурении. При высоком содержании пигментов изменения, характерные для побурения, проявлялись, главным образом в NIR и зеленой области спектра, где вклад Хл и Кар был минимальным.

Глава V. Динамика пигментного состава при фотоадаптации и фотоповреждении на разных этапах развития растений

Изучение оптических свойств растений, предпринятое на предыдущем этапе нашей работы, позволило выявить некоторые закономерности изменения отражения и поглощения света ассимилирующими клетками и тканями при адаптации к высоким потокам излучения в разных спектральных диапазонах (гл. 3), а также при повреждении ими (гл. 4). Наряду с этим были определены спектральные сигнатуры некоторых важных фотозащитных пигментов и их влияние на спектральные свойства растений.

Тем не менее, оставался без ответа ряд важных вопросов, касающихся динамики содержания и состава фотозащитных пигментов при адаптации к высоким потокам ФАР и УФ. Отдельные вопросы удалось решить с использованием недеструктивных методов, позволяющих оценить содержание суммарных Хл, Кар и других групп пигментов. Однако изучение отдельных форм пигментов, например, каротинов, ксантофиллов, включая пигменты, участвующие в виолаксантиновом цикле, а также ЭК, требует применения более точных и селективных хроматографических методов анализа. По результатам предыдуще-

го этапа работы был сделан ряд предположений относительно механизма действия различных групп фотозащитных пигментов. Проверка этих предположений требовала применения биохимического определения содержания отдельных пигментов.

В связи с вышесказанным, в продолжение нашей работы был предпринят более детальный анализ изменений пигментного состава растений, сопровождающий изменения их оптических свойств при фотоадаптации. В отдельных случаях также была прослежена динамика содержания этих пигментов на различных этапах онтогенеза, а также предпринята попытка определения влияния фотоадаптации на онтогенетические изменения пигментного состава.

Динамика содержания Хл и Кар при фотоадаптации. Изучение изменений содержания и соотношения основных фотосинтетических и фотозащитных пигментов растений при фотоадаптации выявило наличие в этих процессах общих тенденций. В целом, эти изменения направлены на снижение потенциально высокой фотодинамической активности Хл и иных естественных фотосенсибилизаторов, присутствующих в клетке [Егоров и др., 1999]. Данная цель может достигаться различными путями, включая снижение содержания Хл и накопление фотозащитных пигментов, в частности, Кар. Рост культур исследованной нами зеленой водоросли *P. incisa* при различной освещенности на полной и безазотной среде сопровождался существенными изменениями пигментного состава (рис. 5). Так, чем больше интенсивность освещения при культивировании, тем меньше Хл и больше Кар накапливали клетки водорослей при росте на полной среде; как следствие, в этом случае быстрее увеличивалось соотношение Кар/Хл (рис. 5, кривая *2*). Хотя у культур, выращенных на безазотной среде при высокой освещенности, происходило относительно небольшое увеличение содержания Кар на фоне снижения содержания Хл, характерном для водорослей, испытывающих дефицит азота [Мег-

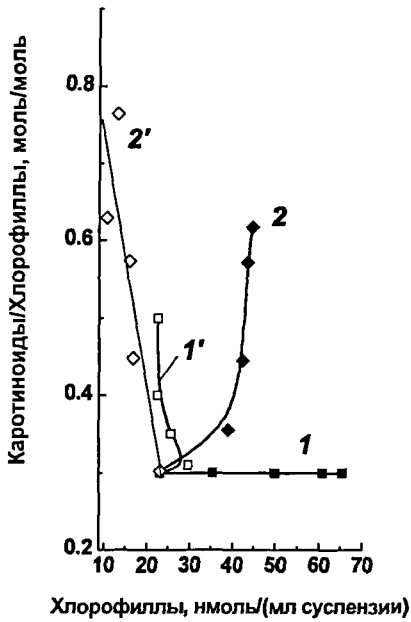

Рис. 5. Зависимость отношения Кар/Хл от суммарного содержания Хл в клетках *P. incisa*, выращенных на полной среде (*1*, *2*) и в отсутствие азота (*1'*, *2'*) при низкой (*1*, *1'*), и высокой (*2*, *2'*) освещенности

zlyak *et al.*, 2007], соотношение между Кар и Хл возрастало значительнее, чем на полной среде (рис. 5, кривая *2'*). Подобные изменения состава пигментов сходны с ответами, типичными для адаптации пигментного аппарата ряда водорослей к интенсивному освещению и дефициту азота [Mendoza *et al.*, Merzlyak *et al.*, 2007].

Тенденция к повышению относительного содержания Кар (за счет накопления дополнительных количеств этих пигментов либо сохранения Кар на фоне снижения содержания Хл) при действии сильного видимого света также характерна для ассимилирующих тканей листьев и плодов высших растений. В частности, при созревании плодов яблони на дереве на солнечной поверхности плодов сохраняется более высокое содержание Кар, чем на теневой, при равном содержании Хл. В результате на солнечной поверхности регистрировали большие исходные значения и более высокую скорость роста соотношения Кар/Хл (рис. 6, темные символы). Следует также отметить, что индукция синтеза Кар, наступающая после съема плодов с дерева, тоже была более выраженной на солнечной поверхности плода по сравнению с теневой (рис. 6, светлые символы; рис. 7, *1–3*).

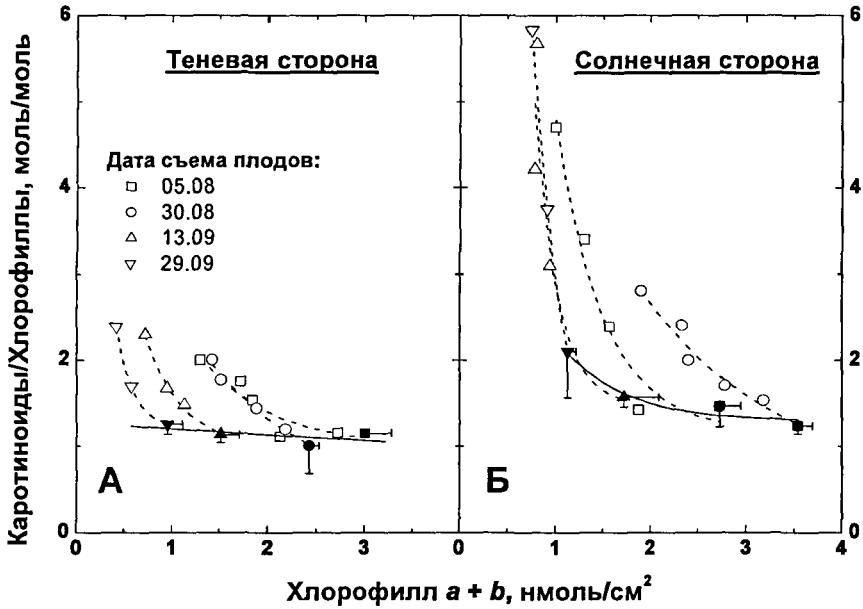

Рис. 6. Зависимость отношения каротиноидов к хлорофиллам от суммарного содержания хлорофиллов в плодах сорта Антоновка Обыкновенная на теневой (А) и солнечной (Б) поверхностях

Приводятся данные для плодов, собранных в 2004 г. Для определения содержания пигментов использовались разработанные ранее методы недеструктивного анализа. *Показаны средние значения (n = 5) и значения стандартной ошибки*

Особенности изменений содержания Хл и Кар при фотоповреждении. Фотоокислительное повреждение тканей растений чрезмерными потоками ФАР сопровождается, наряду с прочими деструктивными процессами, выцветанием пигментов, опосредованным АФК [Мерзляк, 1997–2002; Asada, 2006]. Скорость фотодеструкции пигментов, отличающихся по химической структуре и внутриклеточной локализации, может различаться. Установлено, что Кар, тесно ассоциированные с ФСА, выцветают быстро и синхронно с Хл, подобно тому, как это происходит в растворах при прямом фотосенсибилизированном окислении Кар. В клетках растений, адаптированных к высоким потокам солнечной радиации, а также в стареющих клетках (у культур микроводорослей на стационарной фазе, в осенних листьях и в созревающих плодах) присутствует пул экстратилакоидных или экстрапластидных Кар (о локализации этих Кар см. ниже), не связанных непосредственно с ФСА и отличающихся высокой фотостабильностью. За счет присутствия данного пула Кар, в целом, скорость выцветания этих пигментов может быть ниже, чем у Хл. Как следствие, при фотоповреждениях (как естественных, таких как солнечный ожог плодов яблони, так и индуцированных искусственным облучением повреждениях плодов, листьев и клеток микроводорослей) соотношение Кар/Хл может повышаться даже в большей степени, чем при фотоадаптации. Однако изменения содержания пигментов при фотоповреждении характеризуются снижением содержания Кар, тогда как фотоадаптация сопровождается повышением содержания этих пигментов (см., например, рис. 7).

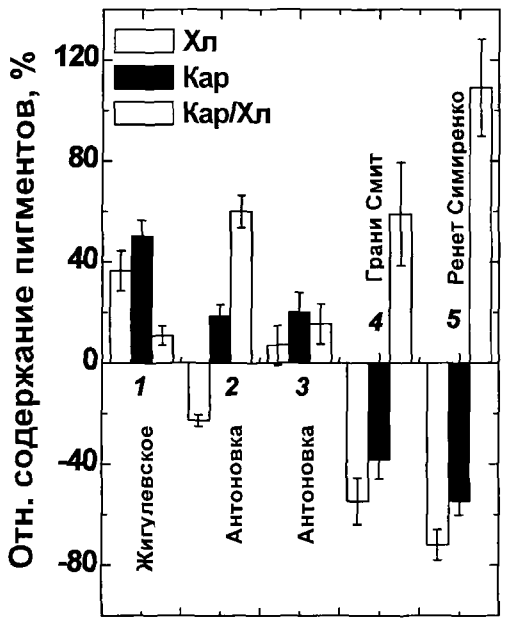

Рис. 7. Изменения в содержании и соотношении Кар и Хл в кожице солнечной поверхности плодов яблони по сравнению с теневой при фотоадаптации (*1–3*) и фотоповреждении (солнечном ожоге; *5*, *4*). Относительное содержание пигментов рассчитано как (S – – H)/H·100%, где S и H — абсолютное содержание пигментов на солнечной и теневой (в случае ожога — поврежденной и интактной) поверхности, соответственно.

Изменения состава Кар микроводорослей при фотоадаптации. Для существования в неблагоприятных условиях, в том числе при чрезмерной освещенности и дефиците минерального питания, некоторые виды микроводорослей выработали ряд адаптационных механизмов, к числу которых относят координированный синтез немембранных липидов, таких как триацилглицериды (ТАГ) [Cohen, 1999; Bigogno, 2002] и каротиноиды (Кар) [Rabbani *et al.*, 1998; Ладыгин, 2000]. Подобные механизмы адаптации выявлены у ряда зеленых водорослей: *Dunaliella salina* [Mendosa *et al.*, 1999], *D. bardawil* [Rabbani *et al.*, 1998], *Haematococcus pluvialis* [Boussiba, 2000] и *Parietochloris incisa* [Khozin-Goldberg *et al.*, 2002; Merzlyak *et al.*, 2007]. Установлено, что характерным ответом *P. incisa* на действие высокой освещенности при отсутствии азота является индукция синтеза Кар при снижении содержания Хл (рис. 5), однако состав накапливающихся при этом Кар, а также роль их отдельных форм в защите от фотоповреждения остаются во многом неясными. Хроматографический анализ выявил у культур *P. incisa*, выращенных при высокой освещенности (рис. 8В, Д), изменения состава Кар, которые могут быть связаны с процессами фотоадаптации. Количественные данные о содержании Кар в культурах, выращенных на полной среде (рис. 5), позволяют предположить, что β-кар и Лют, накапливающиеся на сильном свету, синтезируются *de novo*. В случае культур, испытывающих дефицит азота, это маловероятно, так как общее содержание Кар у них изменялось незначительно. У культур, выращенных на интенсивном свету, повышалась доля Зеа, вероятно, вследствие деэпоксидации Вио (рис. 6), что свидетельствует об эффективном функционировании виолаксантинового цикла у *P. incisa* в условиях стресса. В дальнейшем это было подтверждено измерениями переменной флуоресценции Хл и уровня ее нефотохимического тушения.

Одной из особенностей клеток *P. incisa*, выращенных при интенсивном освещении, оказалось повышение содержания β-кар независимо от наличия азота в среде (рис. 8) как в мембранах тилакоидов, так и в липидных глобулах (ЛГ). В тилакоидах β-кар, локализованный преимущественно в реакционных центрах (РЦ), выполняет защитную функцию, предохраняя компоненты РЦ от фотоокисления [Young, 1991; Demmig-Adams *et al.*, 1996; Ладыгин, 2000]. Выявленные изменения в составе пигментов и липидов, по-видимому, играют важную роль в адаптации *P. incisa* к неблагоприятным условиям. Так, ранее мы обнаружили [Merzlyak *et al.*, 2007], что при длительном культивировании в отсутствие азота в течение двух месяцев на слабом свету в клетках этой водоросли значительно снижается содержание Хл, но возрастает содержание Кар и появляется большое число ЛГ, содержащих ТАГ. Такие клетки проявляли способность к полному восстановлению пигментного аппарата спустя несколько дней после добавления в среду азота.

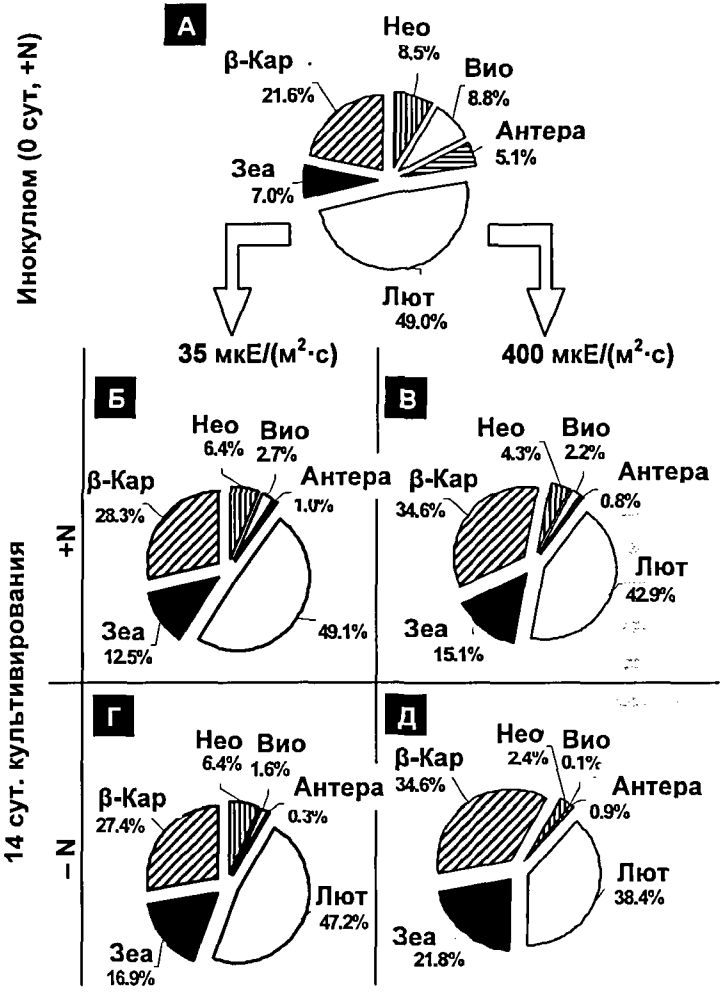

Рис. 8. Состав каротиноидов в клетках *P. incisa* в начале эксперимента (А) и после 14 суток культивирования на полной среде (Б, В) и в отсутствие азота (Г, Д) при низкой (Б, Г) и высокой (В, Д) освещенности

Анализ полученных нами результатов и сопоставление их с литературными данными показывает, что под действием интенсивного освещения в пигментном аппарате *P. incisa* происходят адаптивные изменения, характер которых зависит от наличия азота в среде культивирования. Подобный ответ обнаружен у значительного числа видов зеленых микроводорослей [Rabbani *et al.*, 1998; Mendosa *et al.*, 1999; Boussiba, 2000; Wang *et al.*, 2003].

При росте на полной среде в условиях высокой освещенности наблюдается индукция синтеза Кар, тогда как при дефиците азота более выражено снижение содержания Хл; в обоих случаях состав Кар претерпевает сходные изменения (снижение доли ксантофиллов, участвующих в светосборе [Ладыгин, 2000; Horton, Ruban, 2004], и повышение доли Кар, выполняющих, главным образом, защитные функции). Примечательно, что действие разных стрессоров (недостатка азота при низкой освещенности и сильного света на полной среде) вызывает сходные ответы пигментного аппарата, выраженные в увеличении относительного содержания Кар (рис. 5, 8).

Изменения состава Кар высших растений при фотоадаптации и старении. Известно, что при старении листьев и созревании плодов часто имеет место сохранение Кар и даже индукция синтеза этих пигментов [Gross, 1987; Knee, 1988; Biswal, 1995; Merzlyak *et al.*, 1999] на фоне снижения содержания Хл. Как правило, в стареющих листьях и созревающих плодах значительная часть пула Кар представлена эфирами ксантофиллов и ЖК, локализованными в пластоглобулах хлоропластов, подвергающихся трансформации в геронтопласты и хромопласты [Lichtenthaler, 1969; Tevini, Steinmüller, 1985; Biswal, 1995]. По-видимому, среди прочих функций, физиологическая роль Кар, включая эфиры ксантофиллов (ЭК), накапливающихся в пластоглобулах, заключается в защите от фотоповреждения стареющих тканей растений, ФСА которых подвергается демонтажу [Steinmüller, Tevini 1985; Merzlyak, Hendry, 1994; Merzlyak, Gitelson, 1995]. Изучение состава Кар созревающих плодов яблони показало, что небольшие количества ЭК присутствуют даже среди Кар незрелых плодов, в остальном их состав Кар близок таковому зеленых листьев (рис. 9). Установлено, что несмотря на близкие значения соотношения Кар/Хл на солнечной и теневой поверхностях незрелых плодов, подвергающихся действию интенсивного излучения, состав их Кар обладает рядом различий (рис. 9). Исходя из анализа полученных нами и опубликованных в литературе данных, представляется, что эти различия связаны с адаптацией пигментного аппарата к высоким потокам солнечного излучения. Как и у зеленых водорослей *P. incisa* (рис. 8А, Б). адаптация ФСА ассимилирующих тканей плодов [Blanke, Lenz, 1989] сопровождается, наряду со снижением содержания Хл, уменьшением доли β-кар и ксантофиллов (прежде всего Лют), главной функцией которых является участие в светосборе [Demmig-Adams *et al.*, 1996-2006; Ладыгин, 2000]. Особенностью плодов яблони является индукция синтеза ксантофиллов, в частности Нео и Вио, во время созревания. Согласно результатам анализа тушения флуоресценции Хл, значительная часть синтезируемого при этом Вио не участвует в функционировании виолаксантинового цикла и накапливается, как и Нео, главным образом, в виде эфиров с ЖК (о локализации ЭК см. ниже).

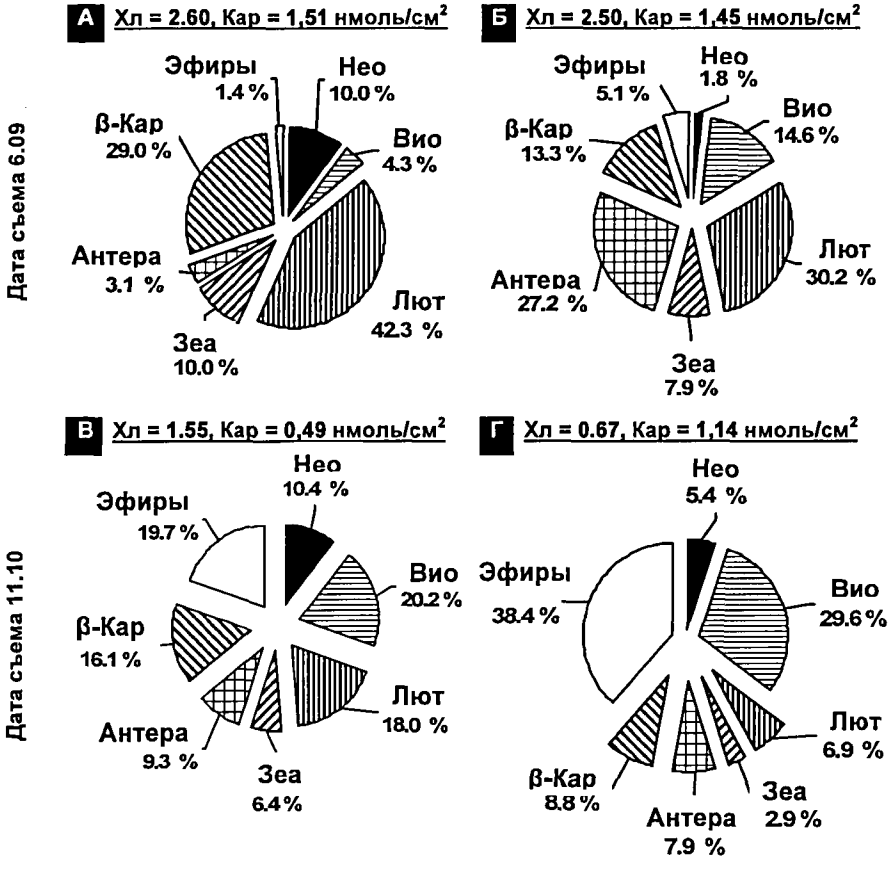

Рис. 9. Изменения состава каротиноидов кожицы плодов яблони на теневой (А, В) и солнечной (Б, Г) стороне плодов на начальных (А, Б) и завершающих (В, Г) этапах созревания

Существенно, что на солнечной поверхности плодов содержание ЭК во всех случаях было больше, чем на теневой, независимо от этапа созревания (рис. 6); накопление ЭК и снижение содержания Лют на солнечной поверхности плодов происходило быстрее, чем на теневой. В стареющих ассимиляционных тканях синтез Кар регулируется с участием этилена [Rhodes, 1980; Vendrell, Palomer, 1998; Cecci *et al.*, 2005]; АФК, которые образуются в условиях фотоокислительного стресса, также входят в число сигнальных молекул, способных индуцировать синтез Кар [Bouvier *et al.*, 1998], и при действии сильного освещения, вероятно, могут потенциировать стимулирующий эффект этилена в отношении синтеза Кар.

Нами установлено, что Кар, накапливающиеся при адаптации плодов к сильному солнечному свету, а также при созревании плодов, вносят значительный вклад в поглощение света тканями и обладают высокой устойчивостью к фотодеструкции (подробнее см. гл. 5 и 6). Это позволяет предположить, что данные пигменты способны играть важную роль в защите ФСА, подвергающегося демонтажу в стареющих клетках растений и в этой связи особенно уязвимого для фотоокислительного повреждения [Kar et al., 1993; Munné-Bosch, Lalueza, 2007]. Примечательно, что картина изменений в составе Кар при адаптации плодов к сильному солнечному свету (накопление ЭК, снижение содержания β-кар и Лют) качественно сходна с таковой, возникающей при их созревании, но указанные изменения на солнечной стороне происходят с большей скоростью, чем на теневой (рис. 6). В этой связи можно думать, что пути метаболизма Кар, функционирующие в стареющих ассимиляционных тканях, способны играть важную роль в адаптации растений к сильному свету, особенно на завершающих этапах их онтогенеза.

УФ-индуцированный синтез ФеС. У растений эта группа соединений характеризуется необычайным разнообразием (число ныне известных природных ФеС превышает 100 000), ФеС обнаружены у всех известных видов растений [Запрометов, 1993]. У растений ФеС выполняют различные функции, и до недавнего времени одной из главных считалась функция защиты от фитопатогенов и травоядных животных [Close, McArthur, 2002], однако в последнее время получила признание и многочисленные подтверждения функция ФеС как фотозащитных веществ [Caldwell *et al.*, 1983; Cockell, Knowland, 1999; Mazza *et al.*, 2000; Merzlyak, Chivkunova, 2000]. Нами изучено значение солнечного УФ для индукции синтеза Фл в тканях растений,

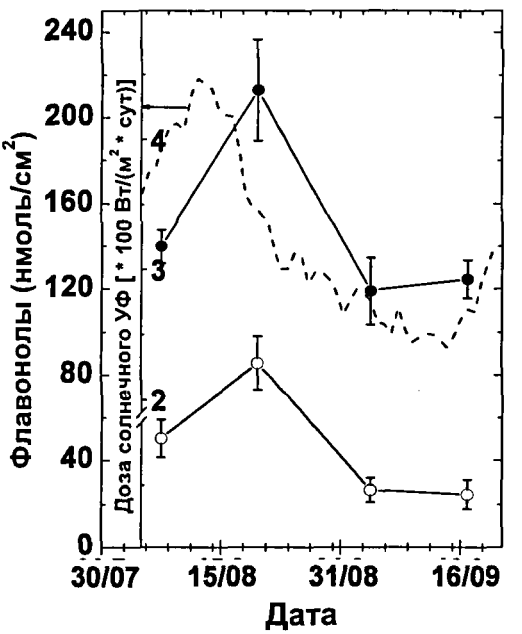

Рис. 10. Изменения содержания флавонолов в кожице теневой (светлые символы) и солнечной (темные символы) плодов яблони сорта Брэберн в связи с суточными дозами солнечного УФ (пунктир)

адаптированных к высоким потокам солнечной радиации, а также динамика ФеС плодов яблони в связи с дозами естественного солнечного УФ (рис. 10). Установлено, что при действии высоких потоков солнечного излучения в кутикуле, эпидерме и гиподерме плодов яблони наблюдается индукция синтеза Фл, представленных преимущественно гликозидами кверцетина, среди которых доминировал рутин. На теневой стороне присутствовали те же ФеС, однако их содержание было в два–три раза меньше. Индукция синтеза Фл носила дозо-зависимый характер: количество Фл было пропорционально дозе солнечного УФ (рис. 10), при этом на всех этапах развития плода, а также на протяжении долговременного хранения содержание Фл на солнечной поверхности плодов оставалось существенно выше, чем на теневой. Следует отметить чрезвычайно высокую фотостабильность Фл *in vivo*: признаков фотодеструкции этих соединений не наблюдалось даже при действии очень высоких доз солнечной радиации, провоцирующих развитие солнечного ожога плодов и приводивших к полному выцветанию Хл и Кар.

Нами также исследована динамика содержания Фл в плодах, подвергавшихся воздействию солнечного излучения, из спектра которого был исключен УФ. Отсутствие УФ компонента приводило к снижению содержания Фл на солнечной поверхности до уровня, характерного для теневой поверхности, но не влияло на содержание Фл на теневой стороне плодов. В аналогичных экспериментах, проведенных с листьями высших растений, также выявлено сохранение содержания Фл на некотором минимальном уровне после исключения УФ из спектра действующего излучения [Lingakumar *et al.*, 1999; Turunen *et al.*, 1999]. Вероятно, этот уровень определяется присутствием конституционных ФеС, а также действием рецепторов излучения в синей области спектра, регулирующих наряду с прочими механизмами синтез ФеС [Mohr, Drumm-Herrell, 1983].

Представляется, что физиологическое значение присутствия Фл и других ФеС в тканях и структурах теневой поверхности плодов может заключаться в защите от повреждающего действия рассеянного УФ, составляющего значительную часть солнечной радиации, рассеиваемой кронами деревьев [Parisi *et al.*, 2000].

Сопоставление результатов анализа фотосинтетических Хл и Кар, а также фотозащитных Фл свидетельствует о том, что исключение УФ компонента из спектра действовавшего на плоды солнечного излучения не влияло на изменения содержания и соотношения Хл и Кар, характерные для адаптации плодов к высоким потокам ФАР (рис. 8 и 9). Это дает основания полагать, что процессы адаптации пигментного аппарата к действию излучения в видимой области спектра протекают до некоторой степени независимо от адаптации к действию солнечного УФ, выраженной в индукции синтеза и накоплении высоких количеств Фл.

Содержание Ант при адаптации к высоким потокам ФАР. Характерным ответом многих видов высших растений на действие высоких потоков солнечного света и ряда других стрессовых факторов на разных этапах онтогенеза является индукция синтеза Ант — соединений фенольной природы, обладающих поглощением в УФ-С и зеленой области видимого спектра [Chalker-Scott, 1999; Merzlyak, Chivkunova, 2000; Hoch *et al.*, 2003]. Известно, что различные таксономические группы растений существенно отличаются способностью к синтезу Ант [Steyn *et al.*, 2000], и следствия этих различий для долговременной фотоадапации до сих пор полностью не выяснены. Синтез Ант является генетически детерминированным ответом, регулируемым фитохромной системой, и в многом зависит от интенсивности действующего солнечного излучения [Saure, 1990]. Нами изучена динамика содержания Ант в сортах Жигулевское, Брэберн, Пинк Леди, а также в листьях некоторых видов растений (табл. 1) при действии интенсивного солнечного света. В плодах яблони и листьях исследованных видов Ант были представлены, главным образом цианидин-3-галактозидом (идеином) и цианидин-3-глюкозидом, соответственно. Плоды, накапливавшие высокие количества Ант на солнечной поверхности, обладали более высоким содержанием Хл на солнечной поверхности, чем в кожице теневой поверхности (рис. 11). Видимо, это объясняется тем, что в присутствие Ант, задерживающих значительную часть падающей ФАР (Merzlyak, Chivkunova, 2000), для поддержания достаточного уровня фотосинтеза требуются бóльшие количества Хл. Следует также отметить, что усиление синтеза Ант наблюдалось на завершающих этапах созревания плодов (рис. 11) и старения листьев, характеризующихся низким содержанием Хл (> 2 нмоль/см^2). Вероятно, дополнительные количества Ант обеспечивают более надежную защиту ФСА, уязвимого для фотоокислительного повреждения в стареющих ассимиляционных тканях [Kar et al., 1993; Munné-Bosch, Lalueza, 2007].

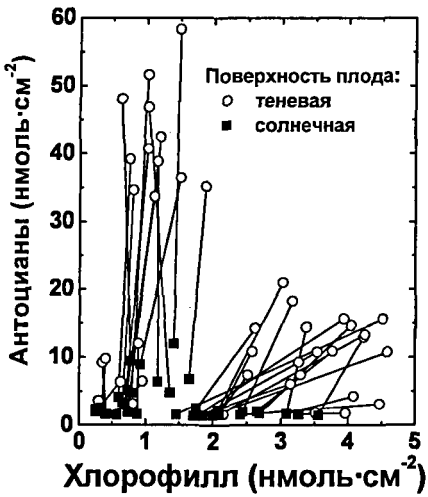

Рис. 11. Содержание антоцианов в кожице теневой (■) и солнечной (○) поверхности плодов яблони сорта Жигулевское в зависимости от содержания хлорофиллов. *Точки, полученные при измерениях на разных поверхностях одного и того же плода, соединены линиями*

Глава VI. Локализация фотозащитных пигментов у растений

Локализация Кар и ЭК. При действии неблагоприятных факторов, в частности чрезмерного освещения, у растений часто наблюдается индукция синтеза экстратилакоидных и экстрапластидных Кар, не передающих энергию возбуждения на Хл [Ben-Amotz *et al.*, 1982; Wang *et al.*, 2003; Merzlyak *et al.*, 2002, 2005; Hormaetxe *et al.*, 2006]. У одноклеточных водорослей эти Кар обычно локализуются в цитоплазматических липидных глобулах [Hanagata, Dubinsky, 1999; Boussiba, 2000] либо в цитоплазме в виде гранул [Rabbani *et al.*, 1998]. Известно, что у некоторых видов зеленых водорослей накопление Кар при стрессах координировано с синтезом нейтральных липидов и формированием цитоплазматических липидных включений [Mendosa *et al.*, 1999].

Мы исследовали локализацию Кар, синтезирующихся при действии света высокой интенсивности в клетках зеленой микроводоросли *P. incisa* (рис. 5, 8, 12). Ранее было ус-

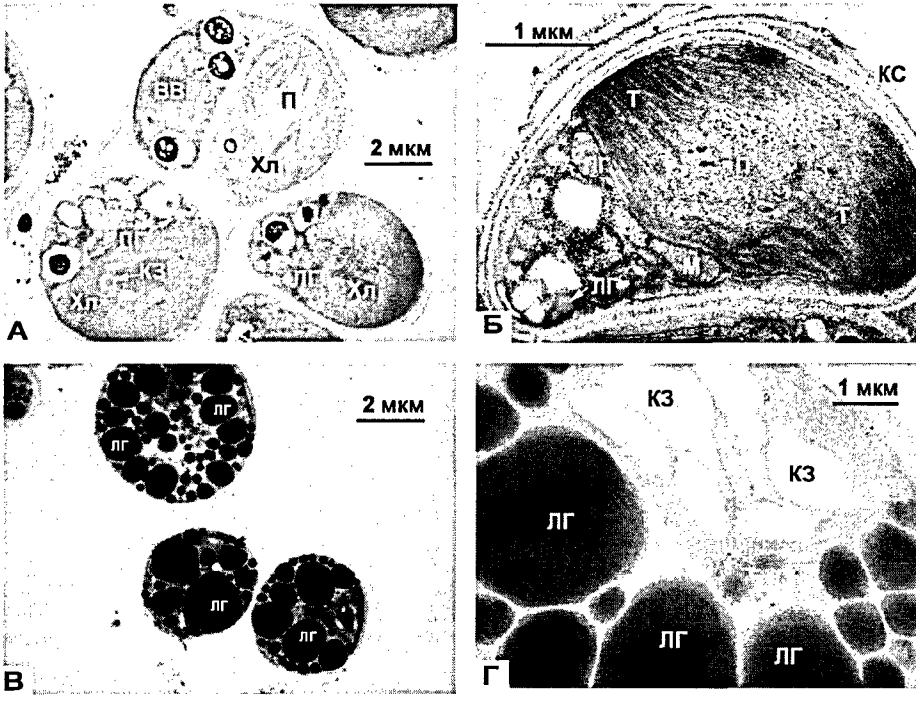

Рис. 12. Ультраструктура клеток (А, В) и хлоропластов (Б, Г) *P. incisa* после 14 дней роста на полной среде (А, Б) и в отсутствие азота (В, Г).
Обозначения: ВВ — внутривакуолярные включения; КЗ — крахмальные зерна; КС — клеточная стенка; ЛГ — липидные глобулы, содержащие β-каротин; М — митохондрии; П — пиреноид; Т — тилакоиды; Хл — хлоропласт

тановлено, что синтез Кар в клетках этих водорослей, культивируемых при интенсивном (200–400 мкЕ/(м^2 с)) освещении, протекает синхронно с синтезом нейтральных липидов, в основном обогащенных арахидоновой кислотой триацилглицеридов (ТАГ), откладывающихся в цитоплазме в виде липидных глобул (ЛГ). Показано также, что рост культуры *P. incisa* в условиях недостатка азота сопровождается глубокими ультраструктурными изменениями пластид, в частности дегенерацией гранально-ламеллярной системы, сопровождающейся образованием ЛГ, число и размеры которых значительно увеличиваются при дефиците минерального питания, особенно азота, и интенсивном освещении (рис. 13). Предполагается, что липиды, в частности ТАГ, служат депо для фотоассимилятов, которые не могут быть утилизированы в неблагоприятных условиях [Bigongo *et al.*, 2002].

Анализ состава пигментов целых клеток, тилакоидов и ЛГ, выделенных из клеток, выращенных при различных интенсивностях освещения, показал, что состав Кар тилакоидов близок к таковому целых клеток, но отличается меньшим содержанием β-кар (рис. 5, 10). По нашим предварительным оценкам, значительная доля (до 66%) β-кар, накапливающегося в стрессовых условиях у *P. incisa* (рис. 5, 8), была локализована в цитоплазматических ЛГ. Полученные в настоящей работе данные позволяют предположить частичную транслокацию β-кар из мембран тилакоидов в ЛГ. Весьма вероятно, что локализованные в этих структурах Кар выполняют защитные функции. Так, обладая антиоксидантными свойствами [Young, 1991], они могут препятствовать перекисному окислению ненасыщенных липидов ЛГ. Наряду с этим, наши данные свидетельствуют, что Кар, локализованные вне тилакоидов, могут играть роль внутриклеточных ловушек света, тем самым защищая хлоропласты от избыточного облучения.

Сравнительное электронно-микроскопическое исследование листьев алоэ с зеленой и красной окраской показало, что наряду с изменением окраски в пластидах происходят значительные изменения ультраструктуры, включая дегенерацию гранально-ламеллярной системы, образование многочисленных пластоглобул и увеличение размеров крахмальных зерен (рис 12А, В). Пластоглобулы представляются наиболее вероятными местами локализации Ркс, накапливающегося при стрессе. Существенно, что, несмотря на столь глубокие изменения, при затенении и/или восстановлении нормального орошения растения восстанавливают зеленую окраску (Gutterman, личное сообщение). Необходимо также отметить сходство ультраструктурных изменений в пластидах *A. arborescens* и других исследованных нами видов растений, для которых характерно накопление высоких количеств Кар при действии интенсивной солнечной радиации. Во всех этих случаях происходит образование многочисленных крупных ЛГ, среди прочего выполняющих функции депо для Кар, обладающих фотозащитными функциями (подробнее см. гл. 5 и 6).

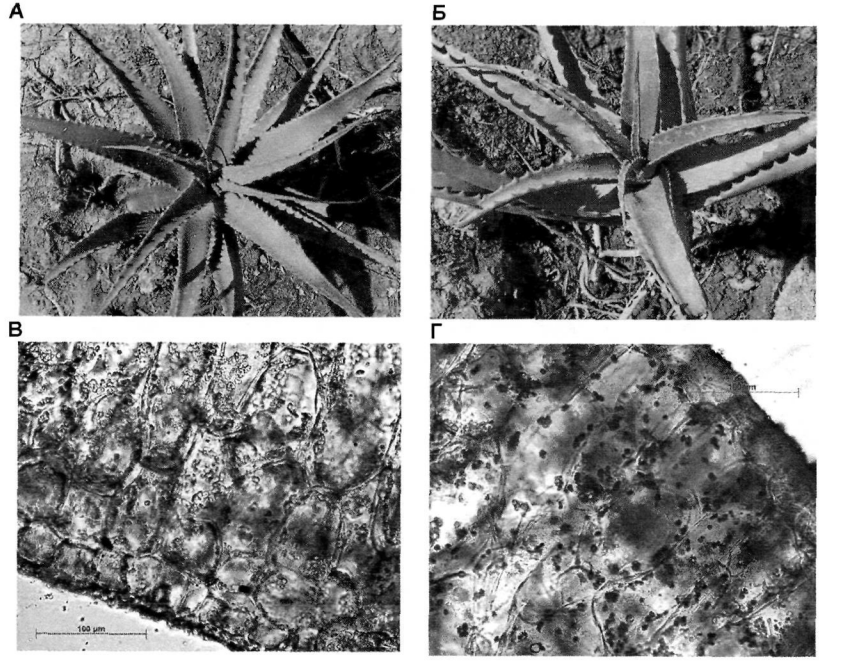

Рис. 12. Внешний вид интактных (А) и подвергшихся действию сильного солнечного света (Б) растений *A. arborescens* и микрофотографии поперечных срезов зеленых (В) и красных (Г) листьев

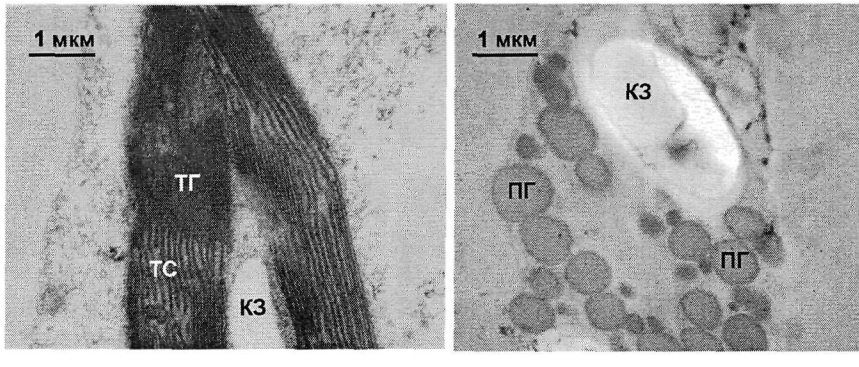

Рис. 13. Изменения ультраструктуры хлоропластов листьев *A. arborescens* при адаптации к сильному свету . Справа — хлоропласт интактного листа, слева — каротиноидопласт из красного листа (см. рис. 12)
Обозначения: КЗ — крахмальные зерна; ТГ — тилакоиды гран; ТС — тилакоиды стромы; ПГ — пластоглобулы

Некоторые ксантофиллы и ЭК, накапливающиеся при адаптации к высоким потокам солнечной радиации, откладываются в пластоглобулах хлоропластов [Hormaetxe *et al.*, 2006]. Подобный механизм обнаружен у ряда видов высших растений с ограниченной способностью к синтезу Ант, в частности у голосеменных из родов *Cryptomeria, Taxodium, Thuja* и ряда других [Ida *et al.*, 1991; Han *et al.*, 2003, 2004] и некоторых цветковых [Diaz *et al.*, 1990]. Для исследования этого механизма мы использовали в качестве модельной системы алоэ древовидное, листья которого при действии интенсивной солнечной радиации и недостатка влаги приобретают красную окраску (рис. 12А, Б) из-за значительного снижения содержания Хл и накопления соединения, идентифицированного как кетокаротиноид родоксантин (Ркс). Микроскопическое исследование, предпринятое с целью выявления локализации этого пигмента, показало, что окрашивание листьев *A. arborescens* в условиях стресса сопровождается сменой окраски пластид с зеленой, характерной для интактных листьев (рис. 12В), на ярко-красную (рис. 12Г) через ряд промежуточных стадий, на которых пластиды приобретали красно-бурую окраску.

Локализация Ант и Фл. У высших растений, обитающих в наземно-воздушной среде, ФеС локализуются преимущественно в поверхностных структурах, включающих кутикулу, эпидерму и ее производные (волоски и трихомы), наиболее подверженных воздействию неблагоприятных факторов [Kolb *et al.*, 2001; Steyn *et al.*, 2002]. Однако в листьях изученных нами видов растений нередко наблюдали накопление Ант и Фл не только в эпидермальных клетках (рис. 14А), но и в вакуолях клеток столбчатого (рис. 14Б, В), а в некоторых случаях и губчатого мезофилла. В плодах яблони Ант и Фл обнаруживали не только в вакуолях клеток эпидермы, но и гиподермы (рис. 15).

Известно, что многие ФеС синтезируются в хлоропластах и цитоплазме и после гликозилирования транспортируются в вакуоли, в которых они накапливаются [Запрометов, Загоскина, 1987; Markham, 1989; Harborne, Williams, 2000], при этом их локальная концентрация достигает весьма высоких значений [Lancaster *et al.*, 1994]. По данным микроспектрофотометрии, локальная концентрация Фл и Ант в вакуолях эпидермы исследованных нами плодов яблони достигала 400 и 200 ммоль/л, соответственно.

Клетки эпидермы экскретируют разнообразные ФеС, включая фенольные кислоты [Burchard *et al.*, 2000] в матрикс клеточных стенок, а также в кутикулу, часть ФеС при этом ковалентно связывается с высшими жирными кислотами кутикулярных восков [Krauss *at al.*, 1997]. Исследование показало, что у плодов яблони фенольные кислоты были локализованы, главным образом, в кутикуле в связанном виде, тогда как в вакуолях их содержание было невысоким. Присутствие Фл, представленных гликозидами кверцетина, обнаружено как в кутикуле, так и в вакуолях клеток эпидермы; при этом в вакуолях со-

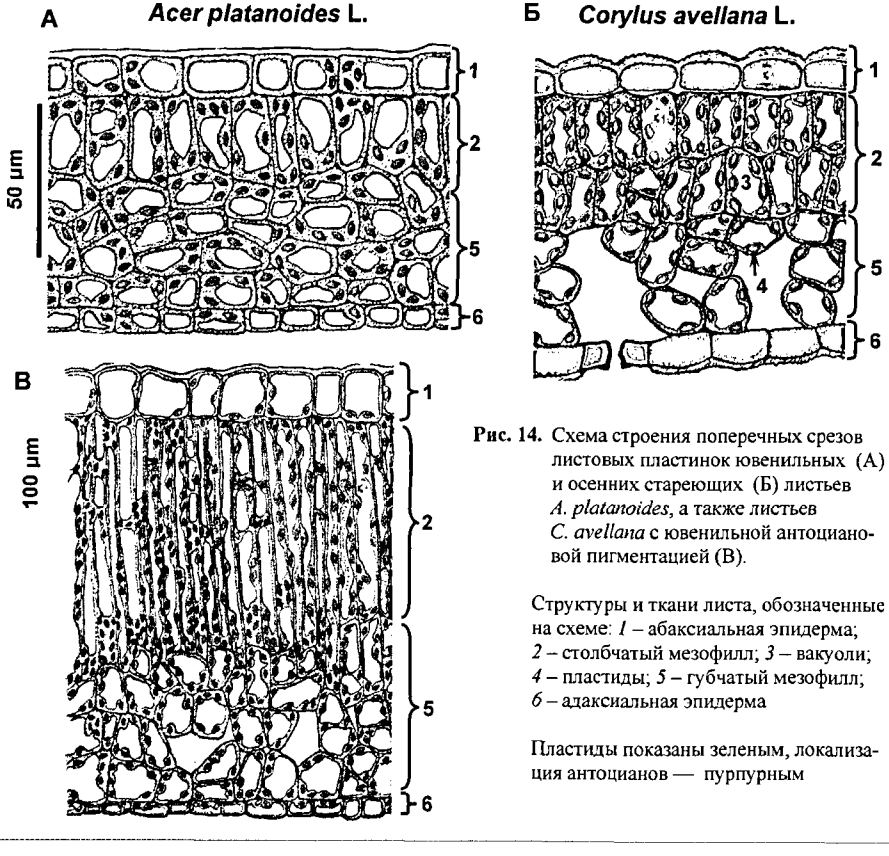

Рис. 14. Схема строения поперечных срезов листовых пластинок ювенильных (А) и осенних стареющих (Б) листьев *A. platanoides*, а также листьев *C. avellana* с ювенильной антоциановой пигментацией (В).

Структуры и ткани листа, обозначенные на схеме: *1* – абаксиальная эпидерма; *2* – столбчатый мезофилл; *3* – вакуоли; *4* – пластиды; *5* – губчатый мезофилл; *6* – адаксиальная эпидерма

Пластиды показаны зеленым, локализация антоцианов — пурпурным

держание Фл было, как правило, в 3–5 раз больше, чем в кутикуле. Установлено, что на солнечной поверхности плодов содержание Фл в кутикуле было значительно больше, чем на теневой, при этом содержание фенольных кислот, связанных с кутикулой, при действии солнечного излучения существенно не изменялось.

Анализ полученных в этой работе и опубликованных в литературе данных позволяет заключить, что синтезируемые при действии высоких потоков солнечной радиации фотозащитные пигменты, отличающиеся по своей химической структуре и путям биосинтеза, локализуются в разных компартментах клетки. Так, неполярные экстратилакоидные Кар и ЭК накапливаются в гидрофобном окружении липидных глобул (цитоплазматических ЛГ, как в случае зеленой микроводоросли *P. incisa*, либо пластоглобулах, как у высших растений). Более полярные ФеС (Ант и Фл) накапливаются при действии интенсивного излучения в вакуолях клеток листьев и плодов, как в плодах яблони. Известно, что в

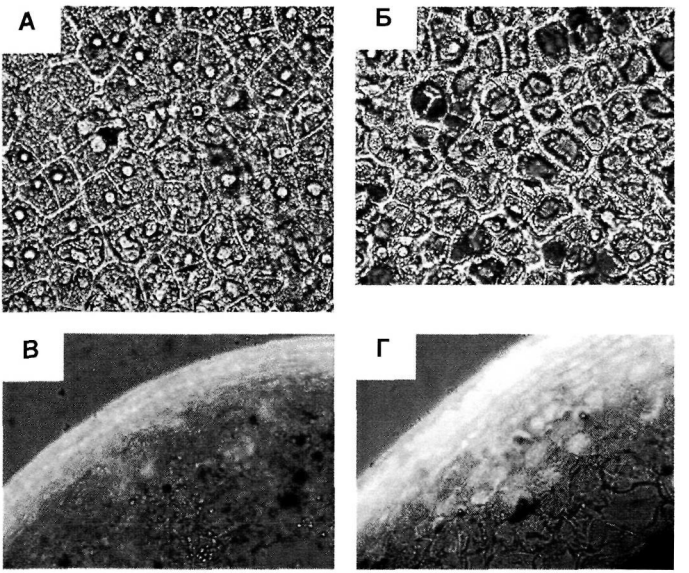

Рис. 15. Эпи- и гиподермальные клетки теневой (А, В) и солнечной (Б, Г) поверхностей плода яблони сорта Жигулевское и люминесцентные (λ_{ex} = 365 нм, $\lambda_{em} \geq 410$ нм) микрофотографии поперечных срезов кожицы с тех же участков (В и Г, соответственно).
Антоцианы локализуются в вакуолях (Б). На поперечных срезах заметна желтая флуоресценция флавонолов в вакуолях эпи- и гиподермы (Г), а также желто-зеленая флуоресценция фенольных кислот в кутикуле (В).

зрелых ассимиляционных тканях растений вакуоли занимают значительную часть объема клетки и выполняют ряд важных физиологических функций [Taiz, 1992], включая осуществление завершающих этапов катаболизма Хл [Hörtensteiner, Matile, 1990–2006]. При этом накопление фотозащитных пигментов в вакуолях может обеспечивать защиту от фотодинамического действия продуктов деградации Хл и других фотосенсибилизаторов, присутствующих в растительной клетке.

Глава VII. Фотозащитные пигменты и устойчивость растений к фотоповреждениям

Важным доказательством наличия у «экранирующего» пигмента фотозащитной функции является повышение устойчивости к фотоповреждению излучением в спектральной полосе, где поглощает данный пигмент, при накоплении его в клетках и тканях. К настоящему времени получены некоторые свидетельства важности фотозащитных пигментов как фактора устойчивости к высоким потокам УФ и видимого излучения [Cockell, Knowland,

1999; Caldwell *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003], однако для детального и количественного описания фотопротекторного эффекта этих данных было недостаточно. С целью оценки фотозащитного эффекта «экранирующих» пигментов использовался анализ кинетик фотодеструкции Хл под действием интенсивного видимого света, а также ингибирования ФС II под действием УФ-В излучения в объектах с различным содержанием фотозащитных пигментов. При этом исследовали параметры линейного транспорта электронов в ЭТЦ хлоропластов в зависимости от содержания экранирующих пигментов и освещенности.

Значение Фл для устойчивости ФСА к действию УФ. Исследование чувствительности ФСА плодов к ингибированию УФ-В излучением показало, что изменения в чувствительности к УФ-повреждению в значительной степени связаны с изменениями в содержании фотозащитных пигментов, преимущественно Фл (рис. 16, 17). В частности, установлено, что при низком содержании Фл происходит быстрое повреждение ФС II даже сравнительно низкими дозами УФ-В излучения (рис. 16, *3*), тогда как при высоком содержании этих пигментов повреждения не наблюдали даже при действии доз УФ, существенно превышающих природные (рис. 16, *1*). О специфичности фотозащитной функции вакуолярных ФеС свидетельствует также высокая корреляция между содержанием этих веществ и устойчивостью фотохимических реакций к ингибированию УФ излучением в листьях [Mazza *et al.*, 2000] и плодах (рис. 17). Следует заметить, что, несмотря на слабое поглощение в УФ-В области спектра, Ант обеспечивали защиту от излучения в этом спектральном диапазоне, если содержались в тканях растений в высоких количествах.

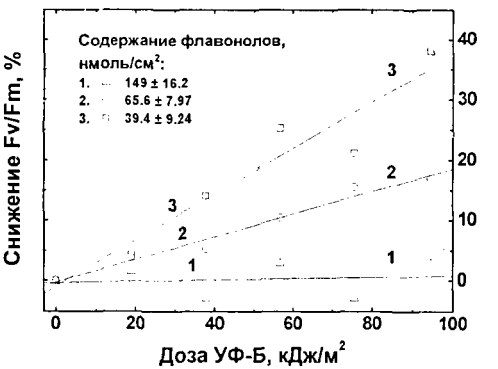

Рис. 16. Зависимость степени повреждения фотосинтетического аппарата плодов яблони сорта Брэберн УФ-В от содержания флавонолов в кожице

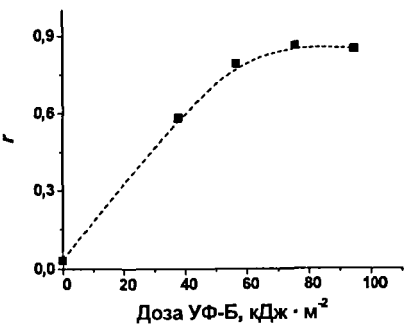

Рис. 17. Корреляция между содержанием флавонолов и интактностью фотосинтетического аппарата в кожице яблок сорта Брэберн при разных дозах УФ-В

Роль Ант в защите от избыточной ФАР. Показано, что Ант накапливаются в тканях растений при действии высоких потоков ФАР, УФ, низких температур и других неблагоприятных факторов [Chalker-Scott, 1999; Saure, 1990; Steyn *et al.*, 2003] и в некоторых случаях оказывают фотозащитное действие [Smillie, Heterington, 1999; Merzlyak, Chivkunova, 2000]. В наших экспериментальных условиях присутствие Ант существенно увеличивало устойчивость фотосинтетических тканей к фотоповреждению. В частности, Хл в содержащих Ант тканях плодов проявлял существенно (в 2,5–3 раза) более высокую устойчивость к фотодеструкции при действии 3000 мкЕ/($м^2$ с) ФАР. Анализ измеренных световых кривых и скорости линейного транспорта электронов в ЭТЦ хлоропластов свидетельствует, что в присутствие экранирующих пигментов (Ант) ФСА листьев исследованных видов проявлял более высокую устойчивость к фотоингибированию. Этот эффект был особенно выражен у ювенильных листьев. Данные эксперименты подтверждают предположение о том, что временная антоциановая пигментация (рис. 13А, Б), защищает ФСА во время формирования [Steyn et al., 2002] и осеннего старения листьев (рис. 13В; Hoch *et al.*, 2003). Стареющие листья более уязвимы для повреждения интенсивным излучением, поскольку на данном этапе онтогенеза более вероятно нарушение регуляции фотосинтеза и увеличение образования АФК [Kar et al., 1993; Munné-Bosch, Lalueza, 2007]. Кроме того, в осенний период на фоне сильного солнечного излучения растения нередко подвергаются действию низких температур, что усиливает риск фотоингибирования. В таких условиях у листопадных древесных растений Ант обеспечивают фотозащиту клеток листьев, необходимую для завершения ретранслокации фотоассимилятов и ценных метаболитов в запасающие органы и успешной подготовки к периоду покоя.

Фотозащитные Кар и устойчивость к фотодеструкции. В отличие от фотозащитных функций ФеС, участие Кар в ослаблении избыточного излучения (главным образом, в видимой области спектра) сравнительно мало изучено, хотя и получен ряд подтверждений наличия этой функции у Кар водорослей и высших растений [Boussiba, 2000; Wang et al., 2003; Hormaetxe *et al.*, 2006]. В этой связи мы обратили особое внимание на фотостабильность Кар, накапливающихся при адаптации к высоким потокам ФАР, а также исследовали их влияние на устойчивость ФСА растений.

Показано, что накопление Кар, часто координированное с синтезом липидов, повышает устойчивость водорослей к действию видимого излучения. Установлено, что при накоплении астаксантина и его эфиров у *H. pluvialis* [Boussiba, 2000] и *P. incisa* даже при действии сильного света сохраняется высокая эффективность работы ФС II. Участие Кар в защите от фотоповреждения путем экранирования избыточного излучения предполагает

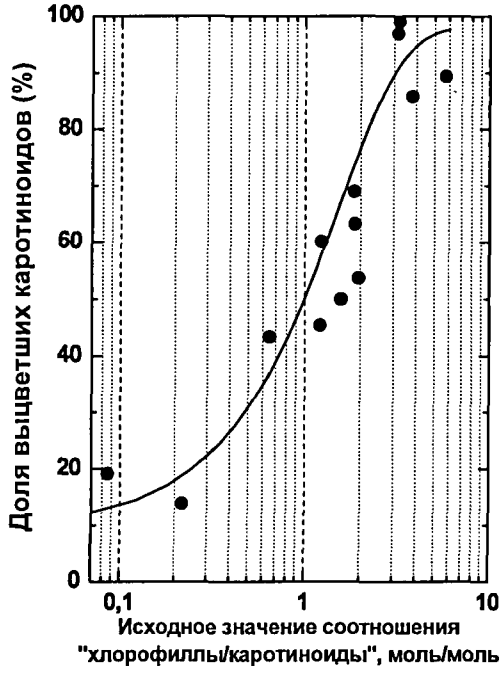

Рис. 18. Фотостабильность Кар плодов яблони сорта Антоновка на разных этапах созревания в зависимости от исходного соотношения Кар/Хл

высокую устойчивость этих пигментов к фотодеструкции. Однако в растворах Кар легко подвергаются разрушению АФК и органическими радикалами [Edge *et al.*, 1997], а также быстро выцветают под действием видимого света в присутствие Хл [Мерзляк и др., 1996; Tregub et al., 1996]. Известно, что при облучении тканей зеленых растений высокими потоками ФАР Кар подвергаются практически полному выцветанию вместе с Хл [Merzlyak et al., 1998]. При исследовании Кар плодов яблони, являющихся удобной моделью для изучения фотодеструкции пигментов в реальном времени, нами установлено, что чувствительность Кар к фотовыцветанию различается на разных этапах онтогенеза (рис. 18).

Нами установлено существование как минимум двух пулов Кар, отличающихся устойчивостью к фотодеструкции. По-видимому, Кар первого пула, полностью и быстро выцветающие синхронно с Хл, тесно ассоциированы с пигмент-белковыми комплексами тилакоидов. Высокую эффективность фотодеструкции этих Кар можно объяснить действием АФК, генерируемых во время работы фотосинтетической ЭТЦ, а также фотодинамическим эффектом Хл. Второй пул Кар, увеличивающийся во время созревания плодов и старения листьев, характеризуется более высокой устойчивостью к фотодеструкции и локализован, по всей видимости, в пластоглобулах хлоропластов. Относительно высокая фотостабильность этих Кар в отсутствие Хл можно объяснить фотофизическими свойствами их возбужденных состояний: в молекулах Кар высших растений и зеленых водорослей переход из основного состояния в первое синглетное состояние, S_1, запрещен, и в отсутствие подходящего донора энергии вероятность заселения триплетных состояний Кар очень низка [Mathis, Kleo, 1973]. Кроме того, фотостабильность Кар *in vivo* может быть обуслов-

лена присутствием в пластоглобулах α-токоферола, обладающего сильной антирадикальной активностью [Hess, 1993].

Как следует из сказанного выше, физиологическая роль Кар, накапливающихся при созревании, старении и фотоадаптации тканей листьев и плодов растений в липидном окружении пластоглобул может быть связана с их вкладом в поглощение света, которое на определенных этапах становится доминирующим, а также их высокой фотостабильностью (рис. 18). Кроме того, Кар и α-токоферол, локальная концентрация которых в пластоглобулах достигает очень высоких значений [Lichtenthaler, 1969; Tevini, Stenmüller, 1985; Stenmüller, Tevini, 1985], могут участвовать в защите от фотоокисления веществ, накапливающихся в этих структурах, таких как ТАГ, ЖК, пренилхиноны [Lichtenthaler, 1969; Tevini, Stenmüller, 1985]. В стареющих тканях растений Кар, благодаря их доминирующему вкладу в поглощение света в сине-зеленой области спектра, также могут снижать риск фотодинамического повреждения компонентов клетки, чувствительных к действию света и кислорода (липидов, ферментов, таких как каталаза, компонентов ЭТЦ), индуцируемого флавинами [Massey, 1994; Егоров и др., 1999], порфиринами [Kreitner *et al.*, 1996], продуктами деградации Хл [Matile *et al.*, 1999] и митохондриальными Fe-S центрами.

Заключение

Результаты настоящей работы свидетельствуют, что механизмы, основанные на экранировании (ослаблении) избыточного излучения, являются важным компонентом системы защиты растений от фотоокислительного повреждения (рис. 19) и имеют большое значение для долговременной адаптации растений к интенсивной солнечной радиации. Проведенные эксперименты показали, что основанные на экранировании механизмы могут функционировать на всех этапах онтогенеза и особенно важны для ювенильных и стареющих растений, в которых эффективность регуляторных и защитных механизмов, в значительной мере обеспечивающих устойчивость ФСА к повреждениям, снижена по сравнению со зрелым растением [Kunert, Ederer, 1985; Kar et al., 1993; Munné-Bosch, Alegre, 2002; Munné-Bosch, Lalueza, 2007]. На основании данных о распространенности и функционировании фотозащитных пигментов, полученных к настоящему времени нами [Соловченко, Мерзляк, 2008], а также опубликованных в литературе [Cockell, Knowland, 1999; Hoch *et al.*, 2003; Hues *et al.*, 2007], можно заключить, что экранирование ФАР и УФ, по-видимому, входит в число универсальных механизмов адаптации растений к интенсивности и спектральному составу освещения. Основное внимание в этой работе уделялось пигментам, играющим важную многогранную роль в реализации механизмов защиты от фотоповреждения посредством ослабления избыточного излучения. В качестве фото-

защитных пигментов у различных таксонов растений выступают самые разные соединения, существенно различающиеся по происхождению, химической природе и внутриклеточной локализации (рис. 11–16). В формировании пула фотозащитных пигментов могут принимать участие разные процессы, такие как синтез *de novo* (как в случае индукции синтеза Фл при действии УФ), индукция каротиногенеза или трансформация предсущест-

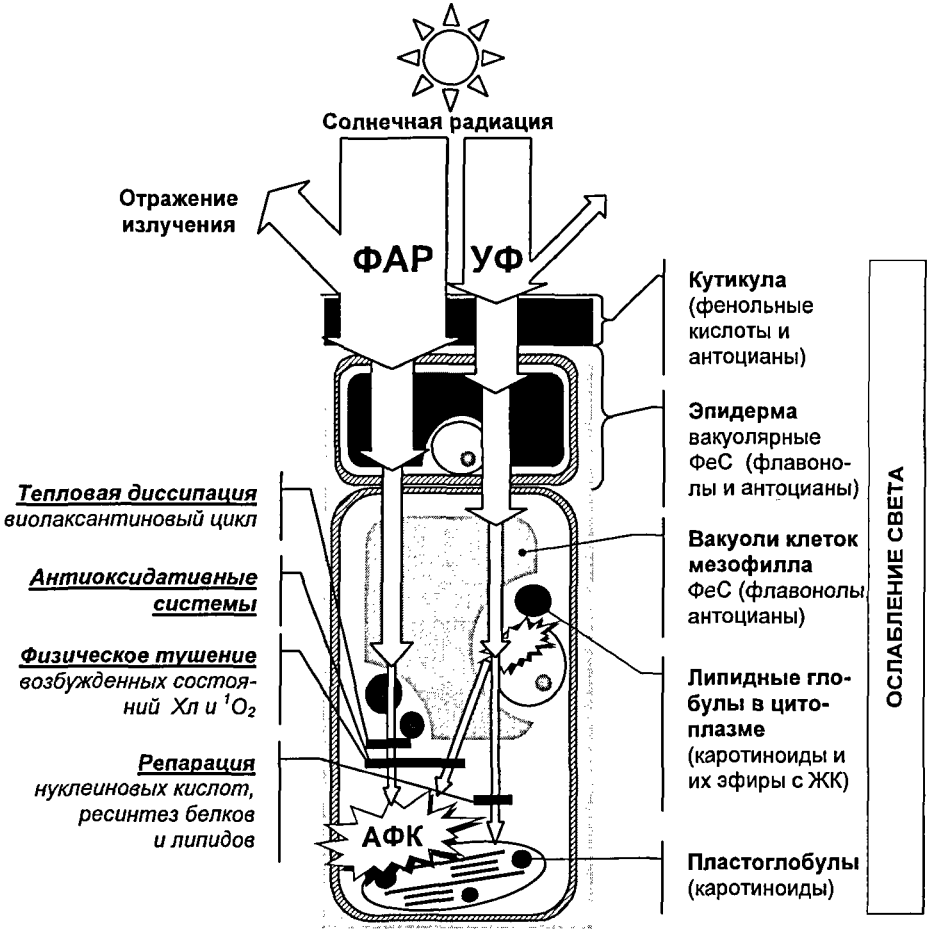

Рис. 19. Основные механизмы развития фотоповреждений и защиты от них у растений. Высокие потоки солнечной радиации в неблагоприятных условиях среды и при нарушении регуляции фотосинтеза приводят к прямым и опосредованным АФК повреждениям. Благодаря целому ряду защитных механизмов снижается уровень АФК и ликвидируются последствия окислительных повреждений. Ослабление падающей радиации фотозащитными пигментами устраняет причину повреждений, возникающих при поглощении избыточной ФАР и действии УФ излучения

вующих Кар при упорядоченном «демонтаже» ФСА в ходе старения листьев и созревания плодов. Эти процессы сопровождаются значительными изменениями не только метаболизма, но и ультраструктуры клеток, в результате которых увеличивается число и размеры сайтов накопления фотозащитных пигментов (в число примеров входит увеличение размеров вакуолей, в которых накапливаются ФеС, и липидных глобул в цитоплазме и строме пластид, играющих роль депо для вторичных Кар).

По данным гистохимических и микроскопических исследований, экранирующие пигменты распределяются в клетках и тканях, образуя подобие «светофильтров» (при эпидермальной локализации этих пигментов), экранирующих нижележащие ассимиляционные ткани, либо внутренних «ловушек» для света, конкурирующих за поглощение света с фотосинтетическими пигментами (см. гл. 6, а также [Merzlyak *et al.*, 2008]). Физиологическое значение накопления фотозащитных пигментов, ослабляющих поток ФАР, заключается в том, что они позволяют растению без риска повреждения восстановить баланс между донорными и акцепторными системами, который часто нарушается при стрессах.

Результаты настоящей работы позволяют сделать заключение о сложном характере адаптивных изменений пигментного состава, зависящих от характера стрессовых воздействий, физиологического состояния и генетических особенностей растения (см. гл. 3–5). Конкретная стратегия фотоадаптации растений, в сущности, определяется генетически детерминированной способностью к синтезу тех или иных групп соединений, «экранирующих» излучение. Результаты наших исследований и сопоставление их с данными, опубликованными в литературе, позволяет выделить несколько вариантов стратегий фотоадаптации. Для большинства низших растений характерно накопление МПА и ограниченного числа примитивных с эволюционной точки зрения простых фенолов либо фенилпропаноидов для защиты от УФ, в экранировании ФАР принимают участие вторичные Кар. По химическому составу они обычно не отличаются от Кар из состава ФСА, например, β-каротин у *P. incisa* (гл. 5) или *Dunaliella* [Pick, 1989; Dubinsky, Hanagata, 2007]. В отдельных случаях к ним добавляются кетокаротиноиды, не участвующие в фотосинтезе, такие как астаксантин у *Haematococcus* [Kobayashi et al., 1993, 1997; Boussiba, 2000; Kobayashi, 2000]. По-видимому, основная их функция в растениях заключается в защите ФСА от фотоокислительного повреждения в неблагоприятных условиях, прежде всего, на сильному свету. Высшие растения отличаются бóльшим разнообразием фотозащитных соединений [Harborne, Williams, 2000]. Как следствие, для них характерны различные варианты адаптивных изменений пигментного состава. Общей чертой всех исследованных видов высших растений является накопление в защитно-покровных тканях разнообразных [Запрометов, 1993; Harborne, Williams, 2000] Фл и фенольных кислот, поглощающих в УФ

области спектра. Более разнообразны пути адаптации к действию излучения в видимой области спектра. У одних видов этот процесс сопровождается повышением соотношения Кар/Хл в хлоропластах, а у других он включает дополнительное накопление пигментов, поглощающих в сине-зеленой области спектра. Как правило, такими пигментами являются Ант. У некоторых таксонов метаболические пути, в которых синтезируются Ант, по не ясным пока причинам функционируют слабо, в таких случаях накапливаются кетокаротиноиды (например, Ркс [Weger *et al.*, 1993; Diaz *et al.*, 1999; Merzlyak *et al.*, 2005; Hormaetxe *et al.*, 2005]) либо беталаины. Обращает на себя внимание сильное сходство выявленных свойств Ркс и Ант *in vivo*, обнаруженное в этой работе). На наш взгляд, эта ситуация является одним из ярких примеров того, как пигменты, абсолютно различные по химической природе, путям биосинтеза и субклеточной локализации, но обладающие сходными спектральными свойствами *in vivo*, играют у разных видов растений сходную роль в обеспечении долговременной адаптации к высоким потокам излучения в видимой области.

Становление и функционирование в растениях описанных выше фотозащитных механизмов сопровождается закономерными и направленными изменениями оптических свойств (поглощения, отражения и рассеяния света) их клеток и тканей. Одним из основных результатов настоящей работы является получение детальной количественной характеристики оптических свойств *in planta* для ряда фотозащитных пигментов (см. гл. 3). Они позволяют заключить, что присутствующие в растениях фотозащитные пигменты способны эффективно ослаблять излучение в очень широком диапазоне, от УФ-В до оранжево-красной области видимого спектра.

Ранее было показано, что целый ряд оптических характеристик, отражающих изменения в соотношении отдельных пигментов, их форм, а также структурные нарушения и повреждения клеток, может быть использован для количественной недеструктивной оценки течения фотоадаптации и фотодеструктивных процессов в клетках и тканях растений *in vivo* [Gitelson *et al.*, 1992–2007; Merzlyak *et al.*, 1995–2006]. Особенностью данной работы является широкое применение недеструктивных оптических методов анализа пигментов. Эти методы позволили получить количественную информации о содержании фотозащитных пигментов и степени адаптированности растений к сильному солнечному свету, а также выявить количественную связь между содержанием фотозащитных пигментов и потенциальной устойчивостью растительного организма к повреждающему действию УФ и высоких потоков ФАР. В заключение необходимо отметить, что, несмотря на достигнутые успехи, приходится констатировать, наши представления о механизмах функционирования фотозащитных пигментов в растениях пока еще далеко не полны, дальнейшее их расширение требует дополнительных исследований.

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ

1) Полученные данные расширяют современные представления о роли фотозащитных пигментов в адаптации растений и защите их от фотоповреждения на различных этапах онтогенеза. Стратегия долговременной фотоадаптации растений в значительной степени определяется их способностью к синтезу различных групп пигментов, экранирующих солнечное излучение.
2) Впервые охарактеризованы спектральные свойства *in vivo* целого ряда фотозащитных соединений: фенольных кислот, флавонолов, антоцианов и каротиноидов. Присутствие этих соединений в очень высоких локальных концентрациях в тканях и отдельных компартментах клетки способно предотвратить повреждающее действие хлорофиллов и других потенциальных фотосенсибилизаторов. Одновременное накопление различных классов фотозащитных пигментов обеспечивает эффективную защиту как на тканевом, так и на клеточном уровнях от повреждения излучением в широком диапазоне длин волн.
3) Выявлены характерные особенности динамики состава фотозащитных пигментов при фотоадаптации и фотоповреждении. Фотоадаптация характеризуется снижением содержания хлорофиллов при сохранении содержания или индукции синтеза экстратилакоидных каротиноидов. Фотоповреждение растений *in vivo* характеризуется глубоким и синхронным разрушением хлорофиллов и каротиноидов, напоминающим их фотосенсибилизированную деградацию в растворах.
4) Приспособление к высоким потокам видимого излучения сопровождается снижением содержания каротиноидов, выполняющих, главным образом, функции светосбора, и повышением содержания экстратилакоидных каротиноидов, обладающих высокой фотостабильностью и не связанных с функционированием фотосинтетического аппарата.
5) Адаптация к интенсивному солнечному излучению часто сопровождается характерными изменениями ультраструктуры (деградацией гранально-ламеллярной системы хлоропластов, образованием в их строме, а также в цитоплазме липидных включений, которые служат в качестве депо для экстратилакоидных каротиноидов).
6) У некоторых видов растений, неспособных к синтезу высоких количеств антоцианов, функции последних выполняют экстратилакоидные каротиноиды, отличающиеся по химической природе и субклеточной локализации, но обладающие сходными спектральными свойствами.
7) Устойчивость фотосинтетического аппарата к повреждению видимым и УФ излучением в значительной степени зависит от содержания фотозащитных пигментов. При высоком содержании флавонолов и антоцианов фотосинтетический аппарат проявлял ус-

тойчивость к действию УФ и видимого излучения при дозах, характерных для естественных условий.

8) Разработаны новые и усовершенствованы существующие недеструктивные методы анализа хлорофиллов, каротиноидов, антоцианов и флавонолов в растениях по спектрам отражения, пригодные для мониторинга физиологического состояния растений и степени их адаптированности к действию видимого и УФ излучения.

Список основных публикаций по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 56 работ, основное содержание отражено в следующих:

1. Соловченко А.Е., Чивкунова О.Б., Мерзляк М.Н., Решетникова И.В. Спектрофотометрический анализ пигментов в плодах яблони // Физиол. раст. 2001. Т. 48(5). С. 801–808.
2. Merzlyak M.N., Solovchenko A.E., Chivkunova O.B.. The strategies of pigment changes involved in adaptation of apple fruit to strong sun-light. 5th conference on oxygen, free radicals and oxidative stress in plants, Nice (France), November 19–21, 2001. Nice, 2001. P. L-41.
3. Chivkunova O.B., Solovchenko A.E., Sokolova S.G., Merzlyak M. N., Reshetnikova I.V., Gitelson A.A. Reflectance spectral features and detection of superficial scald-induced browning in storing apple fruit // J. Russian Phytopathol. Soc. 2001. V. 2. P. 73–77.
4. Соловченко А.Е., Мерзляк М.Н. Определение содержания хлорофиллов, каротиноидов и антоцианов в плодах по спектрам отражения. Материалы III Съезда фотобиологов России, Воронеж, 28 июня – 4 июля 2001 г. Воронеж, 2001. С. 204, 205.
5. Merzlyak M.N., Solovchenko A.E., Chivkunova O.B. Patterns of pigment changes in apple fruits during adaptation to high sunlight and sunscald development // Plant Physiol. Biochem. 2002. V. 40. P. 679–684.
6. Merzlyak M.N., Solovchenko A.E. Photostability of pigments in ripening apple fruit: a possible photoprotective role of carotenoids during plant senescence // Plant Sci. 2002. V. 163. P. 881–888.
7. Sokolskaya S.V., Sveshnikova N.V., Kochetova G.V., Solovchenko A.E., Gostimski S.A., Bashtanova O.B. Involvement of phytochrome in regulation of transpiration: red-/far red-induced responses in the chlorophyll-deficient mutant of pea // Functional Plant Biol. 2003. V. 30. P. 1249–1259.
8. Мерзляк М.Н., Гительсон А.А., Чивкунова О.Б., Соловченко А.Е., Погосян С.И. Использование спектроскопии отражения в анализе пигментов высших растений // Физиол. раст. 2003. 50 (5). С. 785–792.
9. Merzlyak M.N., Solovchenko A.E., Gitelson A.A. Reflectance spectral features and non-destructive estimation of chlorophyll, carotenoid and anthocyanin content in apple fruit //

Postharvest Biol. Technol. 2003. V. 27. P. 197–211.

10. Solovchenko A., Merzlyak M. Optical properties and contribution of cuticle to UV protection in plants: experiments with apple fruit // Photochem. Photobiol Sci. 2003. V. 2. P. 861–866.
11. Solovchenko A., Schmitz-Eiberger M., Significance of skin flavonoids for UV-B-protection in apple fruits // J. Exp. Bot. 2003. V. 54 (389). P. 1977–1984.
12. Соловченко А.Е., Мерзляк М.Н. Пигменты и адаптация растений к солнечному излучению (на примере яблок). III Съезд Биофизиков России, 24–29 июня 2004 г., Воронеж. Тезисы докладов. Т. II. С. 462–464.
13. Merzlyak M.N., Solovchenko A.E., Smagin A.I., Gitelson A.A. Apple flavonols during fruit adaptation to solar radiation: spectral features and technique for non-destructive assessment // J. Plant Physiol. 2005. V. 162(2). P. 151–160.
14. 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.
15. Merzlyak M.N., Chivkunova O.B., Solovchenko A.E.. How plants protect themselves from solar radiation. 1st International conference "Skin & Environment". Moscow – St. Petersburg, Russia. 1–6 June, 2005. P. 42.
16. Solovchenko A., Matthes A., Schmitz-Eiberger M. The role of solar UV in long-term adaptation of ripening apple fruits to high sunlight // J. Appl. Bot. Food Qual. 2005. V. 79. P. 72–76.
17. Alexei E. Solovchenko, Olga B. Chivkunova, Mark N. Merzlyak and Vladimir A. Gudkovsky. Relationships between chlorophyll and carotenoid pigments during on- and off-tree ripening of apple fruits as revealed non-destructively with reflectance spectroscopy. Postharvest Biology and Technology. 2005. 38 (1). 9–17.
18. Мерзляк М.Н., Погосян С.И., Чивкунова О.Б., Соловченко А.Е., Naqvi K.R. Некоторые вопросы спектрофотометрии клеточных суспензий фототрофных микроорганизмов. Материалы Всероссийского симпозиума «Автотрофные микроорганизмы» (памяти академика Е.Н. Кондратьевой). Москва, 21–24 декабря 2005 г.
19. Solovchenko A.E., Avertcheva O.V., Merzlyak M.N. Elevated sunlight promotes ripening-associated pigment changes in apple fruit // Postharvest Biol. Technol. 2006. V. 40. P. 183–189.
20. Merzlyak M.N., Solovchenko A.E., Chivkunova O.B., Khozin-Goldberg I, Didi-Cohen S., and Cohen Z. Effects of light and nitrogen availability on growth and accumulation of arachidonic acid in the microalga *Parietochloris incisa.* // Industrial application of biotechnology / Eds.: Krylov I.A., Zaikov G.E. Nova Science Publishers. Hauppauge, NY, 2006. 9–16.
21. Merzlyak M.N., Chivkunova O.B., Gorelova O.A., Reshetnikova I.V., Solovchenko A.E., Khozin-Goldberg I., Cohen Z. Effect of nitrogen starvation on optical properties, pigments

and arachidonic acid content of the unicellular green alga *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) // J. Phycol. 2007. V. 43. P. 833–843.

22. Solovchenko A.E., Khozin-Goldberg I., Didi-Cohen S., Cohen Z. and Merzlyak M.N. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa* // J. Appl. Phycol. 2008. V. 20(3). 245–225.
23. М.Н. Мерзляк, А.Е. Соловченко, О.Б. Чивкунова, И. Хозин-Голдберг, Ш. Диди-Коэн, Ц. Коэн. Влияние освещенности и азотного голодания на рост и накопление арахидоновой кислоты у одноклеточной водоросли *Parietochloris incisa*. Вестник МГУ. Сер. Биология. 2008. 16(1). 49–53.
24. Мерзляк М.Н., Чивкунова О.Б., Маслова И.П., Накви Р.К., Соловченко А.Е., Клячко-Гурвич Г.Л. Спектры поглощения и рассеяния света клеточными суспензиями некоторых цианобактерий и микроводорослей // Физиол. раст. 2008. Т. 55.(3) 464–470.
25. Соловченко А.Е., Хозина-Голдберг И., Диди-Коэн Ш., Коэн Ц., Мерзляк М.Н. Влияние света и азотного голодания на содержание и состав каротиноидов зеленой водоросли *Parietochloris incisa* // Физиол. раст. 2008. Т. 55 (4). 55(4). 455–462.
26. Соловченко А.Е., Мерзляк М.Н. Экранирование видимого и УФ излучения как фотозащитный механизм растений // Физиол. раст. 2008. Т. 55(6). С. 803–822.
27. Merzlyak M.N., Chivkunova O.B, Solovchenko A.E., Naqvi K.R.. Light absorption by anthocyanins in juvenile, stressed and senescing leaves // J. Exp. Bot. 2008. Т. 59 (14). С. 3903–3911.
28. Solovchenko A.E., Khozin-Goldberg I., Cohen Z., Merzlyak M.N. Carotenoid-to-chlorophyll ratio as a proxy for assay of total fatty acids and arachidonic acid content in the green microalga *Parietochloris incisa* // J. Appl. Phycol. 2008. (В печати.)

Автор выражает глубокую признательность своим учителям: профессорам М.Н. Мерзляку и Л.А. Ищенко, а также благодарит коллег, в соавторстве с которыми выполнены отдельные части работы: к.б.н. О.Б. Чивкунову и И.В. Решетникову, ст.лаб. Н.П. Бузулукову; проф. С.И. Погосяна с кафедры биофизики Биологического факультета МГУ; д-ра И. Хозину-Гольдберг и проф. Ц. Коэна из Университета Бен-Гуриона, а также коллектив кафедры физиологии микроорганизмов Биологического факультета МГУ во главе с проф. Е.С. Лобаковой и академика РАСХН В.А. Гудковского за всемерную помощь этой работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 06-04-03016-б, 06-04-48883-а, 07-04-05007-б) и Совета по грантам Президента РФ (гранты № МК-4008.2005.4, МК-3434908.4).

Подписано в печать 19.01.09
Формат 60x88 1/16. Объем 1 п.л.
Тираж 120 экз. Заказ № 821
Отпечатано в ООО «Соцветие красок»
119991 г.Москва, Ленинские горы, д.1
Главное здание МГУ, к. А-102